



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-143266- -00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD  
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** \_\_\_\_\_

TERAPIA COMPLEMENTARIA CONTRA EL CÁNCER

54. **TITULO** \_\_\_\_\_

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** \_\_\_\_\_

71. **SOLICITANTE** GENENTECH, INC.; NSABP FOUNDATION, INC.

**DOMICILIO** SOUTH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA;  
PITTSBURGH, PA. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.** \_\_\_\_\_

AS: 118.494

PETITOR

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**No. 11-143266- -00000-0000  
Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCRI  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

ión

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130**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.; NSABP FOUNDATION, INC.**

Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América; East Commons Professional Building, Four Allegheny Center, 5th Floor Pittsburgh, PA 15212, Estados Unidos de América; respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América; respectivamente.

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América; respectivamente.

Teléfono: Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

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

3

REPRESENTANTE  
O APODERADONombre: **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 **80.410.337 TP 57492**

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

4

INVENTOR (ES)  
(72)Nombre: **FYFE, Gwendolyn; HEDRICK, Eric; MASS, Robert D.; WOLMARK, Norman.**

Dirección: 20 La Ferrera Terrace, San Francisco, CA 94133, Estados Unidos de América; 59 Hobart Avenue, Summit, NJ 07901, Estados Unidos de América; 106 Elinor Avenue, Mill Valley, CA 94941, Estados Unidos de América; 1201 Murray Hill Avenue, Pittsburgh, PA 15212, Estados Unidos de América; respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América, respectivamente.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/031740Fecha 20.04.2010Publicación Internacional No. WO 2010/123891 A1Fecha 28.10.2010

6 Título (54):

TERAPIA COMPLEMENTARIA CONTRA EL CÁNCER

7 Clasificación Internacional (51): \_\_\_\_\_

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

US

20.04.2009

61/171,008

US

21.04.2009

61/171,318

US

26.05.2009

61/181,195

9 Comprobante de pago No. 11-87814; 11-86246; 11-87874; 11-75369; 11-75367  
11-86254Fecha 18-10-2011

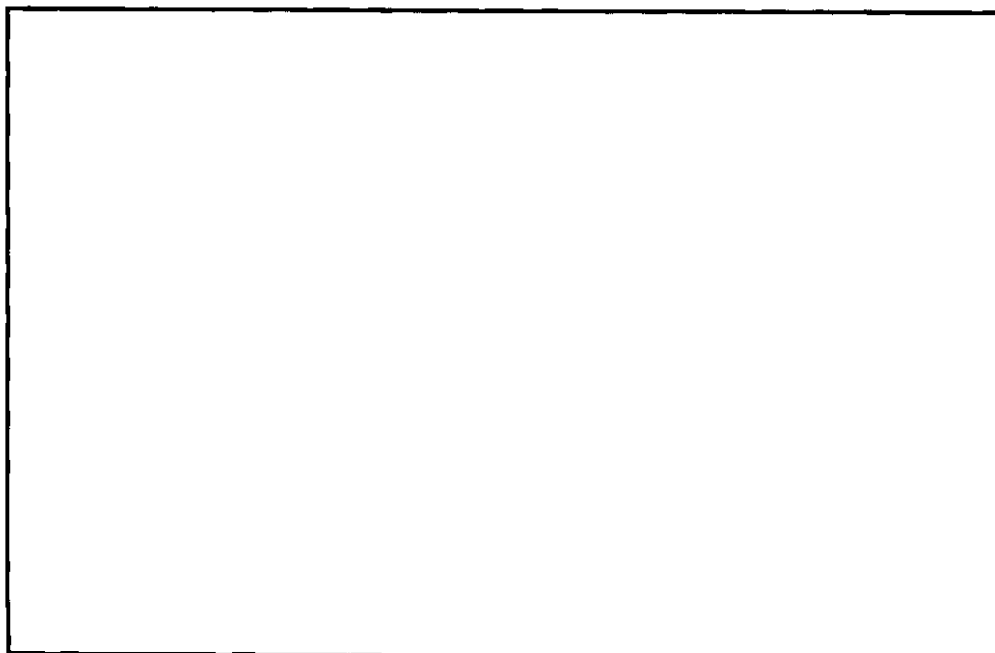
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

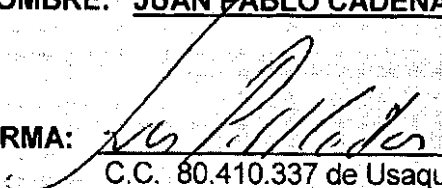
## ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 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. 19.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 648.000 (24\*\$27.000).

## 11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: 

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.

As. 118.494 3

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

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0087814

Bogotá D.C., Septiembre 07 de 2011 - 17:00:11

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

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

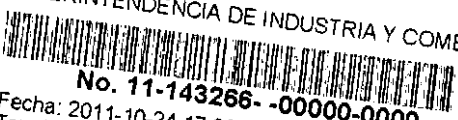
| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411762621 | 07/09/2011 | 31.119.100.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. RENTISTICO          | CONCEPTO                                   | Vr. UNIDITARIO | 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. 11-143266- -00000-0000  
Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131  
  
No. 11-143266- -00000-0000  
Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

AS. 118.494 4

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

|                                          |                |                                               |
|------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------|
| Industria y Comercio<br>SUPERINTENDENCIA | RECIBO DE CAJA | No. 11 - 0086246                              |
|                                          |                | Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49 |

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 | 391971650 | 01/09/2011 | 63.528.100.00 |

|                           |                                         |                                    |                            |
|---------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| *** 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. 11-143266- -00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

No. 11-143266- -00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

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

Septiembre 5 de 2011 - 08:05:12

AS. 118.494 5

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

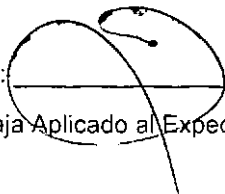
|                                          |                |                                               |
|------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------|
| Industria y Comercio<br>SUPERINTENDENCIA | RECIBO DE CAJA | No. 11 - 0087874                              |
|                                          |                | Bogotá D.C., Septiembre 07 de 2011 - 17:00:11 |

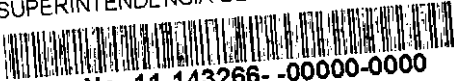
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

|                          |                 |           |           |            |               |
|--------------------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| *** Soporte del Pago *** |                 |           |           |            |               |
| TIPO PAGO                | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
| CONSIGNACION             | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411762621 | 07/09/2011 | 31.119.100.00 |

|                           |                                         |                                    |                            |
|---------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| *** Conceptos Pagados *** |                                         |                                    |                            |
| CANT.                     | RENTISTICO                              | CONCEPTO                           | Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO |
| 1 50005-01-09             | OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 100.000.00 100.000.00      |
|                           |                                         |                                    | \$100.000.00               |
| =====                     |                                         |                                    |                            |

SON: \*\*CIEN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable:   
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
No. 11-143266-00000-0000  
Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131  
  
No. 11-143266-00000-0000  
Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

AS. 118.4946

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



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0075369

Bogotá D.C., Agosto 05 de 2011 - 07:00:02

RECIBIDO DE : BRIGARD

NI 800.134.536

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 391765953 | 04/08/2011 | 36.912.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|----------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 5.000.00       | 5.000.00     |
|       |                                                     |                                    |                | \$5.000.00   |

SON: \*\*CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-143266-00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

No. 11-143266-00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

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

Agosto 5 de 2011 - 07:00:14

AS. 118.4947

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



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0075367

Bogotá D.C., Agosto 05 de 2011 - 07:00:02

RECIBIDO DE : BRIGARD

NI 800.134.536

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 391765953 | 04/08/2011 | 36.912.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|----------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 2.000.00       | 2.000.00     |
|       |                                                     |                                    |                | \$2.000.00   |

SON: \*\*DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-143266- -00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

No. 11-143266- -00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

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

Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mail: [Info@sic.gov.co](mailto:Info@sic.gov.co) Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Agosto 5 de 2011 - 07:00:14

AS. 118.494<sup>8</sup>

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

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0086254

Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49

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 | 391971650 | 01/09/2011 | 63.528.100.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|----------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 1.000.00       | 1.000.00     |
|       |                                                     |                                    |                | \$1.000.00   |

SON: \*\*MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: [Signature]

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-143266-00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

No. 11-143266-00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

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

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

Septiembre 5 de 2011 - 08:05:13

(51) International Patent Classification:  
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2010/031740

(22) International Filing Date:  
20 April 2010 (20.04.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
61/171,008 20 April 2009 (20.04.2009) US  
61/171,318 21 April 2009 (21.04.2009) US  
61/181,195 26 May 2009 (26.05.2009) US

(71) Applicants (for all designated States except US):  
GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990 (US). NSABP FOUNDATION, INC. [US/US]; East Commons Professional Building, Four Allegheny Center, 5th Floor, Pittsburgh, PA 15212 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FYFE, Gwendolyn [US/US]; 20 La Ferrera Terrace, San Francisco, California 94133 (US). HEDRICK, Eric [US/US]; 59 Hobart Avenue, Summit, New Jersey 07901 (US). MASS, Robert D. [US/US]; 106 Elinor Avenue, Mill Valley, California 94941 (US). WOLMARK, Norman [US/US]; 1201 Murray Hill Avenue, Pittsburgh, PA 15212 (US).

(74) Agents: PAZDERA, Minako, R. et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS-49, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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,

[Continued on next page]

(54) Title: ADJUVANT CANCER THERAPY

Arm A:

| Drug        | Dose                                 | Administration                                                                                                                    | Dosing Interval           | Planned Duration |
|-------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------|
| Oxaliplatin | 85 mg/m <sup>2</sup>                 | Administered IV concurrently with separate infusion bags of 250 mL D5W and separate lines connected by Y-line tubing over 2 hours | Day 1<br>q 14 days        | 12 Cycles        |
| Leucovorin  | 400 mg/m <sup>2</sup>                |                                                                                                                                   |                           |                  |
| 5-FU        | 400 mg/m <sup>2</sup>                | IV bolus over 2-4 minutes                                                                                                         | Days 1 and 2<br>q 14 days |                  |
| 5-FU        | 2400 mg/m <sup>2</sup> over 46 hours | IV continuous infusion over 46 hours                                                                                              |                           |                  |

Arm B:

| Drug        | Dose                                 | Administration                                                                                                                                                                   | Dosing Interval           | Planned Duration        |  |
|-------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|--|
| Bevacizumab | 5 mg/kg                              | IV diluted in 100 mL of 0.9% NaCl solution given over a period of:<br>90 minutes – 1st dose<br>60 minutes – 2nd dose<br>30 minutes – all subsequent doses<br>Flush infusion line | Day 1<br>q 14 days        | 12 Months               |  |
| Oxaliplatin | 85 mg/m <sup>2</sup>                 | IV given concurrently with separate infusion bags of 250 mL D5W and separate lines connected by Y-line tubing over 2 hours                                                       | Day 1<br>q 14 days        | 12 Cycles<br>(6 months) |  |
| Leucovorin  | 400 mg/m <sup>2</sup>                |                                                                                                                                                                                  |                           |                         |  |
| 5-FU        | 400 mg/m <sup>2</sup>                | IV bolus over 2-4 minutes                                                                                                                                                        | Days 1 and 2<br>q 14 days |                         |  |
| 5-FU        | 2400 mg/m <sup>2</sup> over 46 hours | IV continuous infusion over 46 hours                                                                                                                                             |                           |                         |  |

FIG. 1

(57) Abstract: Disclosed herein are methods and compositions comprising anti-VEGF antibodies for use in adjuvant cancer therapy.

WO 2010/123891 A1

WO 2010/123891 A1

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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).

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, 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,

- Published:**
- with international search report (Art. 21(3))
  - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

## **TERAPIA COMPLEMENTARIA CONTRA EL CÁNCER**

### **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nro. 61/171.008, presentada el 20 de abril de 2009; la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nro. 61/171.318, presentada el 21 de abril de 2009; y de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nro. 61/181.195, presentada el 26 de mayo de 2009, cuyos contenidos se incorporan en la presente solicitud a modo de referencia.

### **Campo de la invención**

Esta invención se refiere, en general, al tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas humanas. Más específicamente, la invención se refiere al uso de agentes antiangiogénicos en la terapia complementaria contra el cáncer.

### **Antecedentes**

El cáncer es una de las amenazas más nocivas para la salud humana. Solo en los Estados Unidos, el cáncer afecta casi 1,3 millones de nuevos pacientes por año; es la segunda causa principal de muerte después de la enfermedad cardiovascular, y representa aproximadamente 1 de 4 muertes. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de dichas muertes. Si bien ha habido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos tipos de cáncer, la tasa de supervivencia general de 5 años para todos los tipos de cáncer sólo ha mejorado alrededor del 10% en los últimos 20 años. El cáncer, o los tumores malignos, hacen metástasis y crecen rápidamente de manera descontrolada, lo que dificulta extremadamente la detección temprana y el tratamiento.

La mayoría de los métodos actuales para el tratamiento del cáncer son relativamente no selectivos, y en general, se dirigen al tumor después de que el cáncer ha avanzado hasta un estado más maligno. La cirugía remueve el tejido enfermo; la radioterapia achica los tumores sólidos; y la quimioterapia mata rápidamente las células en división. La quimioterapia, en particular, provoca numerosos efectos secundarios, en algunos casos, tan graves que limitan la dosificación que puede suministrarse, y en consecuencia, evitan el uso de fármacos potencialmente eficaces. Además, el cáncer a menudo desarrolla resistencia a los fármacos quimioterapéuticos.

Para la mayoría de los pacientes recientemente diagnosticados con cáncer operable, el tratamiento convencional es la cirugía definitiva, seguida de la quimioterapia. Dicho tratamiento tiene el objetivo de remover la mayor cantidad de la enfermedad primaria y metastásica posible, a fin de evitar la recurrencia y mejorar la sobrevida. De hecho, la mayoría de estos pacientes no tienen evidencia macroscópica de tumor residual luego de la cirugía. Sin embargo, muchos de ellos desarrollan recurrencia más adelante, y finalmente, pueden morir de la enfermedad. Esto puede producirse, por ejemplo, cuando una pequeña cantidad de células tumorales viables hicieron metástasis antes de la cirugía, escaparon a la cirugía y no fueron detectadas luego de la cirugía debido a la limitación de las técnicas actuales de detección.

Por lo tanto, los tratamientos complementarios posoperatorios se tornaron importantes como armas auxiliares a la cirugía, a fin de eliminar estas células neoplásicas micrometastásicas residuales antes del nuevo desarrollo y de la resistencia. Durante las últimas décadas, los avances en la terapia complementaria en general se han incrementado, y se centraron en el uso de diversos agentes quimioterapéuticos. Muchos regímenes quimioterapéuticos han demostrado beneficios clínicos en el tratamiento complementario de pacientes con indicaciones de cáncer mayor en etapa temprana, tal como cáncer de pulmón, mama, y colorrectal. Strauss et al. *J Clin Oncol.*, 22: 7019 (2004); International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaboration Group, *N. Engl. J. Med.*, 350: 351–60 (2004). Moertel et al., *Ann. Intern. Med.*, 122: 321–6 (1995); IMPACT. *Lancet*, 345: 939–44 (1995); Citron et al., *J. Clin. Oncol.*, 21: 1431–9 (2003).

A pesar de los beneficios establecidos de la terapia complementaria sobre la base de la quimioterapia, una limitación importante asociada con la quimioterapia de cualquier clase es la significativa toxicidad. En general, los fármacos quimioterapéuticos no se dirigen al sitio del tumor, y no pueden discriminar entre las células tumorales y las normales. La cuestión de la toxicidad es especialmente desafiante en el contexto de complementario, debido a la larga duración del tratamiento y a su efecto duradero sobre la calidad de vida del paciente. Asimismo, los beneficios de la quimioterapia complementaria en pacientes con menor riesgo de recurrencia aún no son claros, lo que hace cuestionable el uso de la quimioterapia en estos casos en relación con sus efectos secundarios.

La angiogénesis se refiere a una importante secuencia de eventos celulares donde las células endoteliales vasculares proliferan, se cortan y se reorganizan

para formar nuevos vasos a partir de la red vascular preexistente. Hay evidencia vinculante de que el desarrollo de suministro vascular es esencial para los procesos proliferativos normales y patológicos. El suministro de oxígeno y nutrientes, al igual que la remoción de productos catabólicos, representan etapas que limitan la tasa, en la mayoría de los procesos de desarrollo que se producen en organismos multicelulares.

Si bien la inducción de nuevos vasos sanguíneos se considera el modo predominante de angiogénesis tumoral, la información reciente ha indicado que algunos tumores pueden desarrollarse mediante la apropiación de vasos sanguíneos del huésped existentes. La vasculatura de opción conjunta luego retrocede, para conducir a la regresión tumoral, que finalmente es revertida por la angiogénesis inducida por la hipoxia en el límite del tumor.

Uno de los reguladores positivos clave tanto de la angiogénesis normal como de la anormal es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés)-A. VEGF-A es parte de una familia de genes que incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF. VEGF-A se une principalmente a dos tirosina quinasas de receptor de alta afinidad: VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), esta última, la principal transmisora de señales mitógenas de VEGF-A de células endoteliales vasculares. Además, la neuropilina-1 se ha identificado como un receptor para las isoformas de VEGF-A de unión de heparina, y puede cumplir una función en el desarrollo vascular.

Además de ser un factor angiogénico, VEGF, como un factor de crecimiento pleótopo, exhibe múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos, tales como la supervivencia y proliferación de células endoteliales, la permeabilidad vascular y su vasodilatación, la quimiotaxis de monocitos y la afluencia de calcio. Asimismo, otros estudios han informado efectos mitógenos de VEGF sobre algunos tipos celulares no endoteliales, tales como las células epiteliales de pigmento retiniano, las células de conductos pancreáticos y las células de Schwann.

El reconocimiento de VEGF como un regulador primario de la angiogénesis en afecciones patológicas ha conducido a numerosos intentos para bloquear las actividades de VEGF en afecciones que involucran la angiogénesis patológica.

La expresión de VEGF es regulada en forma ascendente en la mayoría de las enfermedades malignas, y la sobreexpresión de VEGF se correlaciona con una etapa más avanzada o con un peor pronóstico en muchos tumores sólidos. Por lo tanto, las moléculas que inhiben las vías de señalización de VEGF se han utilizado

para el tratamiento de tumores sólidos relativamente avanzados donde se observa la angiogénesis patológica.

Debido a que el cáncer continúa siendo una de las enfermedades más nocivas, se necesitan tratamientos adicionales, como la terapia complementaria. La presente invención se dirige a estas y otras necesidades, como será evidente por la reseña de la siguiente descripción.

### **Síntesis de la invención**

El uso de antagonistas específicos de VEGF en combinación con la quimioterapia ha demostrado ser beneficiosa en pacientes con cáncer, por ejemplo, cáncer colorrectal metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, etc., si bien se sabe menos acerca del uso de anticuerpos anti-VEGF en la terapia complementaria. La invención descrita en la presente solicitud se refiere a los resultados obtenidos en estudios clínicos del uso complementario de AVASTIN® en sujetos humanos con cáncer colorrectal no metastásico.

En consecuencia, la invención caracteriza un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente con cáncer, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, durante más de un año. En algunas realizaciones, el método de terapia complementaria extiende la sobrevida libre de enfermedad (DFS, por sus siglas en inglés) o la sobrevida general (OS, por sus siglas en inglés)) en el paciente. En algunas realizaciones, se evalúa la DFS o la OS, por ejemplo, se analiza alrededor de 2 a 5 años luego del inicio del tratamiento. Además, se provee un método de terapia complementaria que comprende la administración a un paciente con cáncer, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora el avance del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año. En algunas realizaciones, el avance del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3 meses o 6 meses luego de que el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF ha cesado. Además, la invención provee un método de terapia complementaria que comprende la administración a un paciente con cáncer, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora la recurrencia del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF dura más de un año. En

algunas realizaciones, la recurrencia del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. En ciertas realizaciones, se administra al paciente el antagonista específico de VEGF luego de la cirugía definitiva. En ciertas realizaciones, la terapia complementaria que comprende la administración del anticuerpo anti-VEGF se continúa durante por lo menos 2 años, por lo menos 3 años, por lo menos 4 años, por lo menos 5 años, por lo menos 10 años o más luego del inicio del tratamiento.

La invención provee un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, de manera de extender la DFS o la OS en el paciente, donde el antagonista específico de VEGF se administra durante más de un año. En algunas realizaciones, la DFS o la OS se evalúan alrededor de 2 a 5 años luego del inicio del tratamiento. Además, se provee un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor primario, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora el avance del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año. En algunas realizaciones, el avance del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. La invención provee adicionalmente un método de terapia complementaria que comprende la administración a un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor primario, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora la recurrencia del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF dura más de un año. En algunas realizaciones, la recurrencia del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. En ciertas realizaciones, la terapia complementaria que comprende la administración del anticuerpo anti-VEGF se continúa durante alrededor de por lo menos 2 años, por lo menos 3 años, por lo menos 4 años, por lo menos 5 años, por lo menos 10 años o más, luego del inicio del tratamiento.

La invención además provee un método de tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor

primario, que comprende la administración al paciente, de terapia complementaria que comprende una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, de modo de extender la DFS o la OS en el paciente, donde el antagonista específico de VEGF se administra durante más de un año. En algunas realizaciones, se evalúa la DFS o la OS, por ejemplo, se analiza alrededor de 2 a 5 años luego del inicio del tratamiento. Se provee además un método de tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor primario, que comprende la administración al paciente, de terapia complementaria que comprende una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora el avance del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año. En algunas realizaciones, el avance del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. La invención provee adicionalmente un método de tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor primario, que comprende la administración al paciente de terapia complementaria que comprende una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora la recurrencia del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF dura más de un año. En algunas realizaciones, la recurrencia del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. En ciertas realizaciones, el método comprende la administración del anticuerpo anti-VEGF durante por lo menos 2 años, por lo menos 3 años, por lo menos 4 años, por lo menos 5 años, por lo menos 10 años o más, luego del inicio del tratamiento.

La invención además provee un método de prevención o demora de la recurrencia del cáncer en un paciente, que comprende la administración al paciente, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, durante más de un año, donde dicha administración del antagonista específico de VEGF, por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF, previene la recurrencia del cáncer. Asimismo, la invención provee un método de disminución de la posibilidad de recurrencia del cáncer en un paciente, que comprende la administración al paciente, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, durante más de un año, donde dicha administración del antagonista específico de VEGF,

por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF, disminuye la posibilidad de recurrencia del cáncer.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de la invención, dicha administración del antagonista específico de VEGF previene o reduce la posibilidad de aparición de un tumor clínicamente detectable, o sus metástasis.

En cada uno de los métodos de la invención, la administración del antagonista específico de VEGF, por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF, se continúa durante por lo menos 2 años, por lo menos 3 años, por lo menos 4 años, por lo menos 5 años, por lo menos 10 años o más, luego del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones, la administración del antagonista específico de VEGF, por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF, se continúa hasta la muerte.

En cada uno de los métodos de la invención, el anticuerpo anti-VEGF puede ser reemplazado por un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, una molécula de receptor de VEGF o molécula de receptor de VEGF quimérica, como se describe a continuación. El anticuerpo anti-VEGF puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo completamente humano, o un anticuerpo humanizado. Ejemplos de anticuerpos útiles en los métodos de la invención incluyen bevacizumab (AVASTIN®), G6-31, B20-4.1 y sus fragmentos. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA  
PGKGLEWVGWINTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED  
TAVYYCAKYPHYYGSSHWYF DVWGQGTLVT VSS (SEC. ID. NRO.: 1)

y una región variable de cadena liviana que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF  
TSSLHSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ  
GTKVEIKR (SEC. ID. NRO.: 2).

En ciertas realizaciones de los métodos de la invención, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

Cada uno de los métodos de la invención puede llevarse a la práctica en relación con el tratamiento de tipos de cáncer que incluyen, sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos tipos de cáncer abarcan cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer

hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de la vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el sujeto tiene cáncer colorrectal no metastásico. En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el sujeto tiene cáncer colorrectal metastásico. En algunas realizaciones, el sujeto tiene carcinoma de colon de etapa II o etapa III resecado.

En realizaciones donde el sujeto ha sido sometido a la cirugía definitiva, el antagonista específico de VEGF, por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF, se administra generalmente después de un período de tiempo en el cual el sujeto se ha recuperado de la cirugía. Este período de tiempo puede incluir el período necesario para la curación de la herida, o para la curación de la incisión quirúrgica; el período de tiempo necesario para reducir el riesgo de dehiscencia de la herida, o el período de tiempo necesario para que el sujeto retorne a un estado de salud esencial similar o mejor al estado de salud previo a la cirugía. El período entre la finalización de la cirugía definitiva y la primera administración del anticuerpo anti-VEGF también puede incluir el período necesario para un descanso de fármacos, donde el sujeto requiere o solicita un período de tiempo entre los regímenes terapéuticos. En general, el período de tiempo entre la terminación de la cirugía definitiva y el comienzo de la terapia de anticuerpo anti-VEGF puede comprender menos de 1 semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas (28 días), 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años, 3 años, o más. En una realización, el período de tiempo entre la cirugía definitiva y la administración del anticuerpo anti-VEGF es superior a 2 semanas e inferior a 1 año. En una realización, el período de tiempo entre la cirugía definitiva y la administración del anticuerpo anti-VEGF es por lo menos 28 días.

Cada uno de los aspectos anteriores puede incluir además el control del sujeto para la detección de la recurrencia del cáncer. El control puede lograrse, por ejemplo, evaluando la sobrevida libre de enfermedad (DFS) o la sobrevida general (OS). En una realización, la DFS o la OS se evalúa aproximadamente 2 a 5 años después del inicio del tratamiento. En una realización, el sujeto está libre de enfermedad durante por lo menos 1 a 5 años después del tratamiento.

De acuerdo con el tipo y la gravedad de la enfermedad, las dosificaciones preferidas para el anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, bevacizumab, se describen en esta solicitud, y pueden variar de aproximadamente 1  $\mu\text{g/kg}$  a aproximadamente 50 mg/kg, con mayor preferencia, de alrededor de 5 mg/kg a alrededor de 15 mg/kg, lo que incluye, sin limitación, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. La frecuencia de administración variará conforme al tipo y la gravedad de la enfermedad. Para las administraciones repetidas durante varios días o períodos mayores, de acuerdo con la afección, el tratamiento se sostiene hasta lograr el efecto terapéutico deseado, medido por los métodos descriptos en esta solicitud o conocidos en el arte. En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se administra una vez por semana, cada dos semanas, o cada tres semanas, en un rango de dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, que incluye, sin limitación, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El avance de la terapia de la invención es controlado con facilidad por ensayos y técnicas convencionales.

En realizaciones adicionales de cada uno de los aspectos anteriores, el antagonista específico de VEGF, por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF, se administra en forma local o sistémica (por ejemplo, por vía oral o intravenosa). En cierta realización, el tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF se prolonga hasta que el paciente ha estado libre del cáncer durante un período de tiempo seleccionado del grupo que consiste en 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años y 12 años.

En otras realizaciones, el tratamiento con el antagonista específico de VEGF es una monoterapia o una monoterapia para la duración del período de tratamiento con el antagonista específico de VEGF, según lo evaluado por el médico o lo descripto en esta solicitud.

En otras realizaciones, el tratamiento con el antagonista específico de VEGF se realiza en combinación con una terapia antineoplásica adicional, que incluye, sin limitación, la cirugía, la terapia de radiación, quimioterapia, terapia de diferenciación, bioterapia, terapia inmunitaria, un inhibidor de la angiogénesis y un compuesto antiproliferativo. El tratamiento con el antagonista específico de VEGF además puede comprender cualquier combinación de los tipos anteriores de regímenes terapéuticos. Asimismo, pueden usarse agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos y antiproliferativos en combinación con el antagonista específico de VEGF. En una realización, la terapia antineoplásica es quimioterapia. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico se selecciona, por ejemplo, de agentes

alquilantes, antimetabolitos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores relacionados; alcaloides de las vincas, epipodofilotoxinas, antibióticos, L-asparaginasa, inhibidor de la topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación de platino, urea sustituida con antracenediona, derivados de metil hidrazina, supresor corticosuprarrenal, adrenocorticoesteroides, progestágenos, estrógenos, antiestrógenos, andrógenos, antiandrógenos, análogo de la hormona liberadora de gonadotropina, etc. En algunos aspectos, el agente quimioterapéutico y el antagonista específico de VEGF se administran en forma concurrente.

En las realizaciones que incluyen una terapia antineoplásica adicional, el sujeto puede tratarse adicionalmente con la terapia antineoplásica adicional antes o después de la administración del antagonista específico de VEGF, o durante dicha administración (por ejemplo, en forma simultánea). En una realización, la terapia antineoplásica es quimioterapia, que incluye la administración de oxaliplatino, 5-fluoruracilo, leucovorina o sus combinaciones. En una realización, el antagonista específico de VEGF, administrado solo o con una terapia antineoplásica, puede administrarse como terapia de mantenimiento.

El método de la invención además es conveniente en la prevención de la recurrencia de un tumor, o el nuevo crecimiento de un tumor, por ejemplo, un tumor latente que persiste luego de la remoción del tumor primario, o en la reducción o prevención de la aparición o proliferación de micrometástasis.

En realizaciones adicionales de cada uno de los aspectos anteriores de la invención, el antagonista específico de VEGF se administra en una cantidad o durante un tiempo (por ejemplo, para un régimen terapéutico particular en función del tiempo) de manera de incrementar o extender (por ejemplo, el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más) la supervivencia de un sujeto que se ha sometido a la cirugía definitiva a fin de tratar el cáncer colorrectal. En un ejemplo, la supervivencia se mide como DFS u OS en el sujeto, donde la DFS o la OS se evalúa alrededor de 2 a 5 años luego del inicio del tratamiento complementario con un antagonista específico de VEGF. En algunas realizaciones adicionales, el antagonista específico de VEGF se usa para prevenir o disminuir la posibilidad de la recurrencia del cáncer, o el avance del cáncer en el sujeto.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

### **Breve descripción de los dibujos.**

La FIGURA 1 representa el régimen de tratamiento para el ensayo C-08. Grupo A: FOLFOX6 modificado (oxaliplatino ( $85 \text{ mg/m}^2$ ) con leucovorina concurrente ( $400 \text{ mg/m}^2$ ) y 5-FU ( $400 \text{ mg/m}^2$ , bolo IV) el Día 1 y 5-FU ( $2400 \text{ mg/m}^2$ ) durante 46 horas el Día 1 y el Día 2), q 14 días durante 12 ciclos (6 meses). Grupo B: FOLFOX6 modificado, q 14 días durante 12 ciclos más bevacizumab administrado antes de oxaliplatino el Día 1 de cada ciclo de quimioterapia ( $5 \text{ mg/kg}$ , IV), q 14 días durante 1 año.

La FIGURA 2 representa el diseño de estudio para el ensayo NSABP C-08. Grupo 1: FOLFOX6 modificado (oxaliplatino ( $85 \text{ mg/m}^2$ ) con leucovorina concurrente ( $400 \text{ mg/m}^2$ ) y 5-FU ( $400 \text{ mg/m}^2$ , bolo IV) el Día 1, y 5-FU ( $2400 \text{ mg/m}^2$ ) durante 46 horas el Día 1 y el Día 2), q 14 días durante 12 ciclos (6 meses). Grupo 2: FOLFOX6 modificado, q 14 días durante 12 ciclos más bevacizumab administrado antes de oxaliplatino el Día 1 de cada ciclo de quimioterapia ( $5 \text{ mg/kg}$  IV), q 14 días durante 1 año.

### **Descripción detallada.**

#### **I. Definiciones.**

El término "VEGF" o "VEGF-A" se usa para hacer referencia al factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos, y factores de crecimiento celular endotelial vascular humanos relacionados de 121, 145, 189, y 206 aminoácidos, como lo describen, por ejemplo, Leung *et al.*, *Science*, 246: 1306 (1989), y Houck *et al.* *Mol. Endocrin.*, 5: 1806 (1991), junto con sus formas alélicas naturales y procesadas. VEGF-A es parte de una familia de genes que incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF. VEGF-A se une principalmente a dos tirosina quinasas de receptor de alta afinidad: VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), está última, la principal transmisora de señales de VEGF-A mitógenas de células endoteliales vasculares. Asimismo, la neuropilina-1 se ha identificado como un receptor para las isoformas de VEGF-A de unión de heparina, y puede cumplir una función en el desarrollo vascular. El término "VEGF" o "VEGF-A" también se refiere a VEGF de especies no humanas, tales como ratón, rata o primate. A veces, el VEGF de una especie específica se indica mediante términos tales como hVEGF, para VEGF humano, o mVEGF, para VEGF murino. El término "VEGF" también se usa para hacer referencia a formas truncadas o fragmentos 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

identificarse en la presente solicitud, por ejemplo, por "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" o "VEGF165". Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativo "truncado" se numeran como se indica en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en VEGF nativo truncado es también 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.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. El anticuerpo seleccionado normalmente tendrá una afinidad de unión para VEGF; por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a hVEGF con un valor  $K_d$  de entre 100 nM y 1 pM. Las afinidades de anticuerpo pueden determinarse, por ejemplo, por medio de un ensayo sobre la base de la resonancia de plasmón de superficie (tal como el ensayo BIAcore descrito en la Publicación de Solicitud PCT Nro. WO 2005/012359); un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo, RIA). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede usarse como agente terapéutico que se dirige a enfermedades o afecciones donde participa la actividad de VEGF, e interfiere con ellas. Además, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, a fin de evaluar su eficacia como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en el arte, y dependen del antígeno blanco y del uso propuesto para el anticuerpo. Ejemplos incluyen el ensayo de inhibición HUVEC; ensayos de inhibición de crecimiento de células tumorales (como se describe en el documento WO 89/06692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, según su sigla en inglés) y citotoxicidad mediada por complemento (CDC, según su sigla en inglés) (Patente de los Estados Unidos Nro. 5.500.362); y ensayos de actividad agonista o hematopoyesis (ver el documento WO 95/27062). 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 "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular o reducir las actividades de VEGF, o de interferir con dichas actividades, que incluyen su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF y sus fragmentos de unión de antígeno; moléculas de receptor y derivados que se unen específicamente a VEGF, para secuestrar así su unión a uno o más receptores; anticuerpos de

receptor anti-VEGF y antagonistas de receptor VEGF tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasas de VEGFR.

Un polipéptido de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido derivado de la naturaleza. De este modo, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de polipéptido natural de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia nativa puede ser aislado de la naturaleza o puede ser producido por medios de síntesis o biotecnológicos. El término polipéptido de "secuencia nativa" contempla específicamente formas secretadas o truncadas naturales del polipéptido (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas alternativamente empalmadas) y variantes alélicas naturales del polipéptido.

Una "variante" de polipéptido significa un polipéptido biológicamente activo que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto al polipéptido de secuencia nativa. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos donde se agregan o deletan uno o más residuos de aminoácidos, en el término N o C del polipéptido. Comúnmente, una variante tendrá por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente, por lo menos alrededor de 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, y aun más preferentemente, por lo menos alrededor de 95% de identidad de secuencia de aminoácidos, con respecto al polipéptido de secuencia nativa.

El término "anticuerpo" se usa en el más amplio sentido, e incluye anticuerpos monoclonal (que abarcan anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos (ver a continuación), siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones, la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es aquella del índice EU como se describe en la referencia de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), expresamente incorporada en la presente solicitud a modo de referencia. El "índice EU como en la referencia de Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU IgG1 humano.

El "Kd" o "valor Kd" de acuerdo con esta invención, en una realización, se

mide por medio de un ensayo de unión de VEGF radiomarcado (RIA) 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, mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de VEGF(109) marcada con ( $^{125}\text{I}$ ) 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 [ $^{125}\text{I}$ ]VEGF(109) con diluciones seriales de un Fab de interés (por ejemplo, Fab-12, (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  $\mu\text{l}$ /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  $K_d$  o valor  $K_d$  usando ensayos de resonancia de plasmón de superficie, empleando un instrumento BIACORE™-2000, o un instrumento BIACORE™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), a 25°C, con chips CM5 de hVEGF(8–109) inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc., con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (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  $\mu\text{g/ml}$  (~ 0,2  $\mu\text{M}$ ), antes de la inyección con un caudal de 5  $\mu\text{l/minuto}$ , 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  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se calculan los índices de asociación ( $k_{\text{on}}$ ) y los índices de disociación ( $k_{\text{off}}$ ) 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  $K_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ . 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.

Un anticuerpo de "bloqueo" o anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista específico de VEGF se une a VEGF e inhibe la capacidad de VEGF para inducir la proliferación celular endotelial vascular o para inducir la permeabilidad vascular. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben por completo la actividad biológica del antígeno.

A menos que se indique lo contrario, la expresión "anticuerpo multivalente" se usa a lo largo de esta memoria descriptiva para denotar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión de antígeno. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente se diseña para tener los tres o más sitios de unión de antígeno, y generalmente, no es un anticuerpo IgA o IgM de secuencia nativa.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, que, en general, incluye un sitio de unión de antígeno del anticuerpo intacto, y en consecuencia, retiene la capacidad de unir antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos contemplados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos cisteína en el término C del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd, que tiene dominios VH y

CH1; (iv) el fragmento Fd', que tiene dominios VH y CH1 y uno o más residuos cisteína en el término C del dominio CH1; (v) el fragmento Fv, que tiene los dominios VL y VH de un solo grupo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature*, 341, 544–546 (1989)), que consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' ligados por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo de cadena simple (por ejemplo, Fv de cadena simple; scFv) (Bird *et al.*, *Science*, 242: 423–426 (1988); y Huston *et al.*, *PNAS (USA)* 85: 5879–5883 (1988)); (x) "diacuerpos", con dos sitios de unión de antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena de polipéptido (ver, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444–6448 (1993)); (xi) "anticuerpos lineales", que comprenden un par de fragmentos Fd uno tras otro (VH–CH1–VH–CH1) que, junto con polipéptidos de cadena liviana complementarios, forman un par de regiones de unión de antígeno (Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8 (10): 1057–1062 (1995); y Patente de los Estados Unidos Nro. 5.641.870).

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 se dirigen contra un solo antígeno. Además, en contraste a las preparaciones de anticuerpos policlonales que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como la necesidad de la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales por ser utilizados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ingeniería genética (ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de genotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descriptas, por ejemplo, en la referencia de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624–628 (1991), o en la referencia de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581–597 (1991).

Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de

unión y reconocimiento de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena liviana en estrecha asociación, que pueden ser de naturaleza covalente, por ejemplo, en scFv. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión de antígeno sobre la superficie del dímero  $V_H-V_L$ . Colectivamente, las seis CDR o un subgrupo de estas 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, habitualmente, a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

De acuerdo con esta solicitud, el "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las porciones de las cadenas liviana y pesada de moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de regiones de determinación de complementariedad (CDR, según su sigla en inglés; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3), y regiones de marco (FR, según su sigla en inglés). El término  $V_H$  se refiere al dominio variable de la cadena pesada (H: *heavy* (pesada)). El término  $V_L$  se refiere al dominio variable de la cadena liviana (L: *light* (liviana)). Conforme a los métodos utilizados en esta invención, las posiciones de aminoácidos asignadas a las CDR y FR pueden definirse de acuerdo con Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)). La numeración de aminoácidos de los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno también es de acuerdo con aquella de Kabat.

De acuerdo con la presente solicitud, el término "regiones de determinación de complementariedad" (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión de antígeno. Cada dominio variable típicamente tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región de determinación de complementariedad puede comprender residuos de aminoácidos de una "región de determinación de complementariedad" como es definida por Kabat (es decir, aproximadamente los residuos 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97 (L3) en el dominio variable de cadena liviana, y 31–35 (H1), 50–65 (H2) y 95–102 (H3), en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), o aquellos residuos de una "anilla hipervariable" (es decir, aproximadamente los residuos 26–32 (L1), 50–52 (L2) y 91–96 (L3) en el dominio variable de cadena liviana, y 26–32 (H1), 53–55 (H2) y

96–101 (H3), en el dominio variable de cadena pesada; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901–917 (1987)). En algunos casos, una región de determinación de complementariedad puede incluir aminoácidos tanto de una región CDR definida de acuerdo con Kabat, como de una anilla hipervariable. Por ejemplo, la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo 4D5 incluye los aminoácidos 26 a 35.

Las “regiones de marco” (de aquí en adelante, FR, según su sigla en inglés) son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de CDR. Cada dominio variable típicamente tiene cuatro FR, identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen de acuerdo con Kabat, los residuos FR de cadena liviana se posicionan aproximadamente en los residuos 1–23 (LCFR1), 35–49 (LCFR2), 57–88 (LCFR3) y 98–107 (LCFR4), y los residuos FR de cadena pesada se posicionan aproximadamente en los residuos 1–30 (HCFR1), 36–49 (HCFR2), 66–94 (HCFR3) y 103–113 (HCFR4), en los residuos de cadena pesada. Si las CDR comprenden residuos de aminoácidos de anillas hipervariables, los residuos FR de cadena liviana se posicionan aproximadamente en los residuos 1–25 (LCFR1), 33–49 (LCFR2), 53–90 (LCFR3) y 97–107 (LCFR4) en la cadena liviana, y los residuos FR de cadena pesada se posicionan aproximadamente en los residuos 1–25 (HCFR1), 33–52 (HCFR2), 56–95 (HCFR3) y 102–113 (HCFR4) en los residuos de cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende aminoácidos tanto de una CDR definida por Kabat, como aquellos de una anilla hipervariable, los residuos FR se ajustarán en forma consecuente. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26–H35, los residuos FR1 de cadena pesada se encuentran en las posiciones 1–25, y los residuos FR2, en las posiciones 36–49.

El fragmento “Fab” contiene un dominio variable y uno constante de la cadena liviana, y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpos  $F(ab')_2$  comprenden un par de fragmentos Fab que, en general, están covalentemente ligados cerca de sus términos carboxi por medio de cisteínas de bisagra entre ellos. Se conocen también en el arte otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de anticuerpos “Fv de cadena simple” o “scFv” comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de anticuerpo, donde estos dominios se presentan en una sola cadena de polipéptido. En general, el polipéptido Fv además comprende un conector de polipéptido entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$ , lo que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una reseña de scFv, ver, por ejemplo, la referencia de Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal*

*Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, 1994, pp. 269–315.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión de antígeno, donde dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena liviana ( $V_L$ ) en la misma cadena de polipéptido ( $V_H$  y  $V_L$ ). Mediante el uso de un conector demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios están obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena, y crean dos sitios de unión de antígeno. 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. Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90: 6444–6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descriptos en la referencia de Zapata *et al., Protein Eng.*, 8 (10): 1057–1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd uno tras otro ( $V_H-C_H1-V_H-C_H1$ ) 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.

Los anticuerpos monoclonales de la presente solicitud incluyen anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas), 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 la actividad biológica deseada (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567; y la referencia de Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81: 6851–6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) donde residuos de una región hipervariable del receptor están 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 deseadas. En algunos casos, los residuos de región de marco (FR) Fv de la

inmunoglobulina humana están reemplazados por correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan 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 regiones 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, por ejemplo, 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 humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano, o que ha sido producido usando cualquiera de las técnicas para la preparación de anticuerpos humanos reveladas en la presente solicitud. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión de antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en el arte. En una realización, el anticuerpo humano se selección de una genoteca de fagos, donde dicha genoteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14: 309–314 (1996); Sheets *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 6157–6162 (1998); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). Los anticuerpos humanos pueden prepararse también mediante la introducción de *loci* (lugares) de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones, donde los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Con el desafío, se observa la producción de anticuerpo humano, que se asemeja estrechamente a aquella observada en humanos en todos los aspectos, que incluyen la redistribución de genes, el montaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779–783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368: 856–859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812–13

(1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14: 845–51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65–93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse mediante la inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno blanco (dichos linfocitos B pueden ser recuperados de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Ver, por ejemplo, las referencias de Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147 (1): 86–95 (1991); y Patente de los Estados Unidos Nro. 5.750.373.

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.*: *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809–3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene*, 169: 147–155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155: 1994–2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154 (7): 3310–9 (1995); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889–896 (1992).

Un "sitio de unión de antígeno funcional" de un anticuerpo es aquel que es capaz de unión a un antígeno blanco. La afinidad de unión de antígeno del sitio de unión de antígeno no es necesariamente tan fuerte como la del anticuerpo progenitor del cual deriva el sitio de unión de antígeno, si bien la capacidad de unión de antígeno debe ser mensurable usando cualquiera de una diversidad de métodos conocidos para la evaluación de la unión de anticuerpo a un antígeno. Además, la afinidad de unión de antígeno de cada uno de los sitios de unión de antígeno de un anticuerpo multivalente de esta invención no necesariamente debe ser la misma desde el punto de vista cuantitativo. Para los anticuerpos multiméricos de esta invención, la cantidad de sitios de unión de antígeno funcionales puede evaluarse usando el análisis de ultracentrifugación que se describe en el Ejemplo 2 de la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. 20050186208. De acuerdo con este método de análisis, se combinan diferentes relaciones de antígeno blanco a anticuerpo multimérico, y el peso

molecular promedio de los complejos se calcula asumiendo diferentes números de sitios de unión funcionales. Estos valores teóricos se comparan con los valores experimentales reales obtenidos, a fin de evaluar la cantidad de sitios de unión funcionales.

Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo designado es aquel que posee una o más de las características biológicas de dicho anticuerpo que lo distinguen de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

A fin de detectar sistemáticamente anticuerpos que se unen a un epítipo en un antígeno ligado por un anticuerpo de interés, puede efectuarse un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como aquel descrito en la referencia titulada: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988).

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 ( $K_d$ ) no superior a alrededor de  $1 \times 10^{-7}$  M, preferentemente, no superior a alrededor de  $1 \times 10^{-8}$  M, y con mayor preferencia, no superior a alrededor de  $1 \times 10^{-9}$  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 cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos que se definen con anterioridad, si bien, habitualmente, es un anticuerpo humanizado o humano.

De acuerdo con la presente solicitud, el término "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie, donde uno o más de los residuos de aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie han sido modificados. Dichas mutantes, necesariamente, tienen menos del 100% de identidad de secuencia con respecto al anticuerpo dependiente de la especie. En una realización, la mutante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 75% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos o bien del dominio variable de cadena

pesada o del de cadena liviana del anticuerpo dependiente de la especie, más preferentemente, por lo menos 80%, más preferentemente, por lo menos 85%, más preferentemente, por lo menos 90%, y con mayor preferencia, por lo menos 95%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en esta solicitud como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similares (es decir, residuo de aminoácido del mismo grupo, sobre la base de las propiedades de cadenas laterales comunes; ver a continuación), con respecto a los residuos de anticuerpos dependientes de la especie, luego de la alineación de las secuencias y de la introducción de espacios, si fueran necesarios, a fin de lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Se interpretará que ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales, o internas en la secuencia de anticuerpo fuera del dominio variable afecta la identidad o similitud de secuencia.

A fin de incrementar la semivida de los anticuerpos o polipéptidos que contienen las secuencias de aminoácidos de esta invención, puede adjuntarse un epítipo de unión de receptor de rescate al anticuerpo (en especial, un fragmento de anticuerpo), como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.739.277. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de unión de receptor de rescate puede ligarse en marco a un ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptido de esta invención, de modo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico diseñada comprende el epítipo de unión de receptor de rescate y una secuencia de polipéptido de esta invención. De acuerdo con esta invención, el término "epítipo de unión de receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, o IgG<sub>4</sub>) que es responsable del aumento de la semivida sérica *in vivo* de la molécula IgG (por ejemplo, ver la referencia de Ghetie *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 18: 739–766 (2000), Tabla 1). Los anticuerpos con sustituciones en una de sus regiones Fc y mayores semividas séricas se describen además en los documentos WO 00/42072, WO 02/060919; las referencias de Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276: 6591–6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.*, 279: 6213–6216 (2004)). En otra realización, la semivida sérica también puede incrementarse, por ejemplo, mediante la unión de otras secuencias de polipéptido. Por ejemplo, pueden unirse anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los métodos de la invención, a albúmina sérica o una porción de albúmina sérica que se une al receptor FcRn, o un péptido de unión de albúmina sérica, de

modo que la albúmina sérica se une al anticuerpo o polipéptido; por ejemplo, dichas secuencias de polipéptido se describen en el documento WO 01/45746. En una realización, el péptido de albúmina sérica por unir comprende una secuencia de aminoácidos de DICLPRWGCLW. En otra realización, se aumenta la semivida de un Fab por estos métodos. Ver, además, la referencia de Dennis *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277: 35035–35043 (2002), para secuencias de péptidos de unión de albúmina sérica.

Una "proteína de receptor de VEGF quimérica" es una molécula de receptor de VEGF que tiene secuencias de aminoácidos derivadas de por lo menos dos proteínas diferentes, por lo menos una de las cuales es como la proteína de receptor de VEGF. En ciertas realizaciones, la proteína de receptor de VEGF quimérica es capaz de unión a la actividad biológica de VEGF, y de su inhibición.

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 proteináceos o no proteináceos. En ciertas realizaciones, el 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 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.

El término "fragmento" significa una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, preferentemente, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o más, de la longitud entera del polipéptido o la molécula de ácido nucleico de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ó 100, 200, 300, 400, 500, 600, o más nucleótidos, o 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 aminoácidos o más.

Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a un agente de peso molecular pequeño, un polinucleótido, 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 indeseable, 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), e inhibidores anti-PDGFR (sigla en inglés de "receptor de factor de crecimiento derivado de plaqueta") tales como GLEEVEC® (Imatinib Mesilato). Los agentes antiangiogénicos además incluyen inhibidores de la angiogénesis naturales, 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 cita 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 cita factores antiangiogénicos conocidos); y Sato (2003), *Int. J. Clin. dOncol.* 8: 200-206 (por ejemplo, la Tabla 1, que cita agentes antiangiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

Una "dosis de carga", en esta solicitud, comprende generalmente una dosis inicial de un agente terapéutico administrada a un paciente, que es seguida de una o más dosis de mantenimiento de dicho agente. En general, se administra una sola dosis de carga, si bien se contemplan múltiples dosis de carga en esta solicitud. Habitualmente, la cantidad de dosis de carga administrada excede la cantidad de dosis de mantenimiento administrada, o las dosis de carga se administran en forma más frecuente que las dosis de mantenimiento, de manera de lograr la concentración uniforme deseada del agente terapéutico antes que lo que puede lograrse con las dosis de mantenimiento.

Una dosis de "mantenimiento" en esta solicitud se refiere a una o más dosis de un agente terapéutico, administradas al paciente durante un período de tratamiento, o luego de un período de tratamiento. Habitualmente, las dosis de mantenimiento se administran con intervalos de tratamiento espaciados, por ejemplo, aproximadamente una vez por semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas, o aproximadamente cada 4 semanas.

El cáncer "operable" se refiere a cáncer que se limita a un órgano primario,

y es adecuado para la cirugía.

El término “sobrevida” se refiere a que el paciente sigue vivo, e incluye la supervivencia libre de enfermedad (DFS) y la supervivencia general (OS). La supervivencia puede calcularse por el método de Kaplan–Meier, y cualquier diferencia en la supervivencia se computa usando el ensayo de rango log estratificado.

La “supervivencia libre de enfermedad (DFS)” se refiere a que el paciente sigue vivo, sin retorno del cáncer, durante un período de tiempo definido tal como aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 10 años, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En un aspecto de la invención, la DFS se analiza de acuerdo con el principio de intención de tratamiento, es decir, los pacientes son evaluados sobre la base de su terapia asignada. Los eventos utilizados en el análisis de DFS pueden incluir la recurrencia local, regional y distante del cáncer, la aparición de cáncer secundario y la muerte por cualquier causa en pacientes sin un evento anterior (por ejemplo, recurrencia de cáncer colorrectal o segundo cáncer primario).

La “supervivencia general” se refiere a que el paciente sigue vivo durante un período de tiempo definido, tal como aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 10 años, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En los estudios que sostienen la invención, el evento utilizado para el análisis de supervivencia fue la muerte por cualquier causa.

El término “extensión de la supervivencia” o “aumento de la probabilidad de supervivencia” significa el aumento de la DFS o la OS, o el aumento de la probabilidad de seguir vivo o libre de enfermedad en un punto determinado del tiempo en un paciente tratado, en relación con un paciente no tratado (es decir, en relación con un paciente no tratado con un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF), o en relación con un protocolo de tratamiento de control, tal como el tratamiento solo con el agente quimioterapéutico, por ejemplo, los agentes utilizados en las normas asistenciales para el cáncer colorrectal, tales como leucovorina, 5-fluoruracilo, oxaliplatino, irinotecano o sus combinaciones. La supervivencia se controla durante por lo menos alrededor de dos meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, o por lo menos alrededor de 1 año, por lo menos alrededor de 2 años, por lo menos alrededor de 3 años, por lo menos alrededor de 4 años, por lo menos alrededor de 5 años, o por lo menos alrededor de 10 años, etc., luego del inicio del tratamiento o luego del diagnóstico inicial.

La "relación de riesgo" en el análisis de la sobrevida es una síntesis de la diferencia entre dos curvas de sobrevida, que representa la reducción del riesgo de muerte con tratamiento, en comparación con el control, durante un período de seguimiento. La relación de riesgo es una definición estadística para índices de eventos. Para los propósitos de la presente invención, la relación de riesgo se define de modo de representar la probabilidad de un evento en el grupo experimental, dividido por la probabilidad de un evento en el grupo de control, en un punto de tiempo específico.

El término "de manera concurrente" o "concurrentemente" se usa en esta solicitud para hacer referencia a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde por lo menos parte de las administraciones se superponen en el tiempo. En consecuencia, la administración concurrente incluye un régimen de dosis donde la administración de uno o más agentes continúa luego de discontinuar la administración de uno o más agentes adicionales.

El término "monoterapia" significa un régimen terapéutico que incluye solo un agente terapéutico para el tratamiento del cáncer o de un tumor durante el curso del período de tratamiento. La monoterapia usando un antagonista específico de VEGF significa que el antagonista específico de VEGF se administra en ausencia de una terapia antineoplásica adicional durante el período de tratamiento.

La "terapia complementaria", en esta solicitud, se refiere a la terapia proporcionada luego de la cirugía definitiva, después de la cual no puede detectarse evidencia de enfermedad residual, de manera de reducir el riesgo de recurrencia, local o metastásica. La meta de la terapia complementaria es prevenir o demorar la recurrencia del cáncer, y por lo tanto, reducir la posibilidad de muerte relacionada con el cáncer.

La "terapia de mantenimiento" significa un régimen terapéutico que se suministra a fin de reducir la probabilidad de avance o recurrencia de la enfermedad, luego de un resultado beneficioso de una intervención terapéutica inicial. La terapia de mantenimiento puede proporcionarse durante cualquier cantidad de tiempo, lo que incluye períodos de tiempo prolongados que comprenden toda la vida del sujeto. La terapia de mantenimiento puede proporcionarse después de la terapia inicial, o en conjunto con terapias iniciales o adicionales. Las dosificaciones utilizadas para la terapia de mantenimiento pueden variar, e incluyen dosificaciones menores en comparación con las dosificaciones utilizadas para otros tipos de terapia.

En la presente solicitud, las "normas asistenciales" de quimioterapia se refieren a los agentes quimioterapéuticos utilizados rutinariamente para el tratamiento de un tipo de cáncer particular.

La "cirugía definitiva" se usa tal como se emplea el término dentro de la comunidad médica, y típicamente, se refiere a la cirugía donde el resultado es potencialmente curativo. La cirugía definitiva incluye, por ejemplo, procedimientos, quirúrgicos o diferentes, que logran la remoción o resección del tumor, que abarcan aquellos que logran la remoción o resección de la totalidad del tumor bastante visible. La cirugía definitiva incluye, por ejemplo, la resección completa o curativa o la resección basta completa del tumor. La cirugía definitiva incluye procedimientos que se producen en una o más etapas, y comprende, por ejemplo, procedimientos quirúrgicos de múltiples etapas, donde uno o más procedimientos quirúrgicos o diferentes se efectúan antes de la resección del tumor. La cirugía definitiva abarca procedimientos que logran la remoción o resección del tumor, lo que incluye órganos involucrados, partes de órganos y tejidos, al igual que órganos circundantes, tales como nodos linfáticos, partes de órganos o tejidos.

Los términos "cáncer" y "neoplásico" describen o se refieren a la afección fisiológica en mamíferos, típicamente caracterizada por el crecimiento celular no regulado. Se incluyen en esta definición los tipos de neoplasias malignas y benignas, al igual que tumores latentes o micrometástasis. 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, 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 del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal (que incluye cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de la vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, al igual que linfoma de células B (que incluye linfoma no hodgkiniano (NHL, según su sigla en inglés) folicular/de bajo grado; NHL linfocítico pequeño (SL, según su sigla 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, según su sigla en inglés); leucemia linfoblástica aguda (ALL, según su sigla en inglés); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD, según su sigla en inglés), al igual que la proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como aquel asociado con tumores cerebrales) y síndrome de Meigs.

El término "metástasis" significa la diseminación del cáncer desde su sitio primario, o hacia otros lugares del organismo. Las células neoplásicas pueden abandonar un tumor primario, penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circular a través del torrente sanguíneo y crecer en un foco distante (metástasis) en tejidos normales en otro sitio del organismo. La metástasis puede ser local o distante. Se cree que la metástasis es un proceso secuencial, dependiente de las células tumorales que se desprenden del tumor primario, viajan a través del torrente sanguíneo y se detienen en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un suministro de sangre, y pueden desarrollarse para formar una masa potencialmente mortal. Este comportamiento es regulado tanto por vías moleculares estimulantes como inhibitorias dentro de la célula tumoral, y las interacciones entre la célula tumoral y las células huéspedes en el sitio distante son también significativas.

El término "micrometástasis" significa una pequeña cantidad de células que se han diseminado desde el tumor primario hacia otras partes del organismo. Las micrometástasis pueden ser detectadas o no detectadas en una detección sistemática o un ensayo de diagnóstico.

La "recurrencia del cáncer", en esta solicitud, se refiere a un retorno del cáncer luego del tratamiento, e incluye el retorno del cáncer en el órgano primario, al igual que la recurrencia distante, donde el cáncer retorna fuera del órgano primario.

Un sujeto con "alto riesgo de recurrencia del cáncer" es aquel que tiene mayor posibilidad de experimentar la recurrencia del cáncer. Por ejemplo, los sujetos relativamente jóvenes (por ejemplo, menos de aproximadamente 50 años de edad), aquellos con nodos linfáticos positivos, en particular, 4 o más nodos linfáticos involucrados (lo que incluye 4–9 nodos linfáticos involucrados, y 10 o más nodos linfáticos involucrados), y aquellos con tumores mayores que 2 cm de diámetro, por ejemplo, en pacientes de cáncer de mama. El nivel de riesgo de un sujeto puede ser determinado por un médico experto. En general, dichos sujetos con alto riesgo

tendrán compromiso de nodos linfáticos (por ejemplo, con 4 o más nodos linfáticos involucrados); sin embargo, los sujetos sin compromiso de nodos linfáticos también son de alto riesgo, por ejemplo, si los tumores son mayores que 2 cm, o iguales a 2 cm.

La “disminución del riesgo de recurrencia del cáncer” significa la reducción de la probabilidad de experimentar la recurrencia del cáncer, en relación con un paciente no tratado (es decir, en relación con un paciente no tratado con un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF), o en relación con un protocolo de tratamiento de control, tal como el tratamiento solo con el agente quimioterapéutico, por ejemplo, aquellos utilizados en las normas asistenciales para el cáncer colorrectal, por ejemplo, leucovorina, 5-fluoruracilo, oxaliplatino, irinotecano una de sus combinaciones. La recurrencia del cáncer se controla durante por lo menos alrededor de dos meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses o por lo menos alrededor de 1 año, por lo menos alrededor de 2 años, por lo menos alrededor de 3 años, por lo menos alrededor de 4 años, por lo menos alrededor de 5 años o por lo menos alrededor de 10 años, etc., luego del inicio del tratamiento o del diagnóstico inicial.

El “inicio del tratamiento” se refiere al inicio de un régimen de tratamiento luego de la remoción quirúrgica del tumor. En una realización, este inicio del tratamiento puede hacer referencia a la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos luego de la cirugía. Alternativamente, puede hacer referencia a una administración inicial de un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, y uno o más agentes quimioterapéuticos.

La “curación” del cáncer en la presente solicitud significa la ausencia de la recurrencia del cáncer aproximadamente 2, 3, 4 ó 5 años después del comienzo de la terapia complementaria, de acuerdo con el tipo de cáncer.

El término “tumor”, de acuerdo con esta solicitud, se refiere a toda proliferación y crecimiento de células neoplásicas, malignas o benignas, y a todos los tejidos y células preneoplásicos y neoplásicos.

La “inactividad o latencia tumoral” significa un estado inactivo prolongado en el cual se presentan células tumorales, si bien el avance del tumor no es clínicamente evidente. Un tumor latente puede ser detectado o no detectado en una detección sistemática o en un ensayo de diagnóstico.

El término “sujeto” significa un mamífero, que incluye, sin limitación, un mamífero humano o no humano, tal como vaca, caballo, perro, oveja o gato.

Preferentemente, el sujeto es un humano. En la presente solicitud, los pacientes también son sujetos.

Una "población" de sujetos se refiere a un grupo de sujetos con cáncer, por ejemplo, en un ensayo clínico, o el observado por los oncólogos luego de la aprobación, por ejemplo, la aprobación de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América (FDA), de una indicación particular, tal como la terapia complementaria contra el cáncer.

El término "terapia antineoplásica" o "terapia contra el cáncer" se refiere a una terapia útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes terapéuticos antineoplásicos incluyen, sin limitación, la cirugía, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en la 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 (Tarceva<sup>TM</sup>), inhibidores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (por ejemplo, Gleevec<sup>TM</sup> (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, BlyS, APRIL, BCMA o receptores de VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes bioactivos y químicos orgánicos, etc. Se contemplan también en esta invención las combinaciones de dos o más de estos agentes.

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, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de plantas o animales, que incluyen sus fragmentos y variantes.

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 sarcodictina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, 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 gamma1I y caliqueamicina omega1I (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, doxorubicina 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, propionato de dromostanolona, 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; diaziquna; 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 tenuazónico; 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.), ABRAXANE® 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, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva®)) y VEGF-A, que reducen la proliferación celular; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Se incluyen además en esta definición los 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, según su sigla 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 regula 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, ribozima ANGIOZYME®) 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; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células, que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas de polipéptidos tradicionales. Se incluyen entre las citoquinas la hormona de crecimiento, tal como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana N-metionilo y la hormona de crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como la hormona estimulante de foliculo (FSH, según su sigla en inglés), la hormona estimulante tiroidea (TSH, según su sigla en inglés) y la hormona luteinizante (LH, según su sigla en inglés); factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factores alfa y beta de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de Müller; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso (NGF, según su sigla en inglés), tales como NGF-alfa; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento de transformación (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factores-I y -II de crecimiento de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones, tales como interferones alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF, según su sigla en inglés), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1; IL-1alfa, IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores de polipéptidos, entre ellos, LIF y ligando de equipo (KL). Conforme a esta solicitud, el término "citoquina" incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinadas y equivalentes biológicamente activos de citoquinas de secuencias nativas.

Un "agente inhibidor del crecimiento", utilizado en la presente solicitud, se

refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento 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<sup>®</sup> y los inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, 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 "profármaco", de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a un precursor o una forma derivada de un agente farmacéuticamente activo, que es menos citotóxico para las células tumorales, 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  $\beta$ -lactámicos, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida; profármacos de 5-fluorocitosina 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 "terapia de radiación" significa el uso de rayos beta o rayos

gamma dirigidos para inducir suficiente daño a una célula, de modo de limitar su capacidad para funcionar normalmente o para destruir la célula. Se apreciará que habrá muchas formas conocidas en el arte para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se suministran como una administración de una sola vez, y las dosificaciones típicas varían de 10 a 200 unidades (Gray) por día.

La expresión "reducir o inhibir" significa la capacidad para lograr una disminución general, preferentemente, del 20% o más, más preferentemente, del 50% o más, y con mayor preferencia, del 75%, 85%, 90% , 95% o más. La reducción o inhibición puede hacer referencia a los síntomas del trastorno tratado, a la presencia o el tamaño de las metástasis o micrometástasis, al tamaño del tumor primario, la presencia o el tamaño del tumor inactivo, o el tamaño o la cantidad de los vasos sanguíneos en los trastornos angiogénicos.

El término "infusión intravenosa" se refiere a la introducción de un fármaco en la vena de un paciente animal o humano, durante un período de tiempo mayor que aproximadamente 5 minutos, preferentemente, entre alrededor de 30 y 90 minutos, si bien, de acuerdo con la invención, la infusión intravenosa se administra, alternativamente, durante 10 horas o menos.

El término "bolo intravenoso" o "estímulo intravenoso" se refiere a la administración de fármaco en la vena de un animal o un ser humano, de manera que el organismo recibe el fármaco en aproximadamente 15 minutos o menos, preferentemente, en 5 minutos o menos.

El término "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco debajo de la piel de un paciente animal o humano, preferentemente, dentro de una cavidad entre la piel y el tejido subyacente, mediante la liberación relativamente lenta y sostenida desde un receptáculo de fármaco. La cavidad puede crearse pellizcando o tirando la piel hacia arriba para alejarla del tejido subyacente.

El término "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco debajo de la piel de un paciente animal o humano, preferentemente, dentro de una cavidad entre la piel y el tejido subyacente, mediante la liberación relativamente lenta y sostenida desde un receptáculo de fármaco, durante un período de tiempo que comprende, sin limitación, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión puede realizarse mediante el implante subcutáneo de una bomba de suministro de fármaco implantada debajo de la piel del paciente animal o humano, donde la bomba libera una cantidad predeterminada de

fármaco, durante un período de tiempo predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un lapso que abarca todo el período del régimen de tratamiento.

El término "bolo subcutáneo" se refiere a la administración de fármaco debajo de la piel de un paciente animal o humano, donde la liberación del bolo de fármaco preferentemente se realiza en menos de alrededor de 15 minutos, más preferentemente, en menos de 5 minutos, y con mayor preferencia, en menos de 60 segundos. La administración preferentemente se efectúa dentro de una cavidad entre la piel y el tejido subyacente, donde la cavidad se crea, por ejemplo, pellizcando o tirando la piel hacia arriba para alejarla del tejido subyacente.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiará con el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF. El término 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 cáncer; tumores malignos y benignos; leucémicas y enfermedades linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, trastornos macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir la cantidad de células neoplásicas; puede reducir el tamaño del tumor; 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. Para el tratamiento de la inactividad o latencia tumoral o las micrometástasis, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir la cantidad o la proliferación de micrometástasis; reducir o prevenir el crecimiento de un tumor latente; o reducir o prevenir la recurrencia de un tumor luego del tratamiento o la remoción (por ejemplo, usando una terapia antineoplásica tal como la cirugía, la terapia de radiación o la quimioterapia). Hasta el punto en que el fármaco puede prevenir el crecimiento o producir la muerte de células neoplásicas existentes, el fármaco puede ser citostático o citotóxico. Para la terapia contra el cáncer la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, mediante la evaluación de la duración de la sobrevida, la sobrevida libre

de enfermedad (DFS), el tiempo hasta el avance de la enfermedad (TTP, según su sigla en inglés), la duración de la sobrevida libre de enfermedad (PFS, según su sigla en inglés), los índices de respuesta (RR, según su sigla en inglés), la duración de la respuesta, el tiempo en remisión y la calidad de vida. La cantidad eficaz puede mejorar la sobrevida libre de enfermedad (DFS), puede mejorar la sobrevida general (OS), puede disminuir la probabilidad de recurrencia, extender el tiempo hasta la recurrencia, extender el tiempo hasta la recurrencia distante (es decir, la recurrencia fuera del sitio primario), puede curar el cáncer, mejorar los síntomas del cáncer (por ejemplo, evaluados usando una encuesta específica para cáncer), puede reducir la aparición de segundo cáncer primario, etc.

El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento abarcan los que ya poseen el trastorno, al igual que aquellos en los que debe prevenirse el trastorno, que incluyen aquellos en los cuales debe prevenirse la aparición o recurrencia del cáncer.

El "tratamiento activo", de acuerdo con esta solicitud, se refiere al período de tiempo durante el cual el fármaco terapéutico es administrado al paciente. Por ejemplo, si un fármaco terapéutico es administrado al paciente cada 2 semanas durante el curso de un año, seguido de ningún tratamiento o de ninguna otra terapia, entonces el tratamiento activo con el fármaco terapéutico es el período de un año durante el cual se administró el fármaco al paciente.

El término "marca", utilizado en esta solicitud, se refiere a un compuesto o una composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al polipéptido. 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 una composición o un compuesto de sustrato detectable.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente y patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente solicitud a modo de referencia, al mismo alcance que si cada publicación, patente o solicitud de patente independiente fuera específica e individualmente indicada para ser incorporada a modo de referencia.

## **II. Antagonistas y anticuerpos anti-VEGF.**

### ***(i) Antígeno VEGF.***

El antígeno VEGF por ser utilizado para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, la molécula VEGF<sub>165</sub>, al igual que otras isoformas de VEGF o

uno de sus fragmentos que contiene el epítipo deseado. Otras formas de VEGF útiles para la generación de anticuerpos anti-VEGF de la invención serán evidentes por los expertos en el arte.

Se obtuvo VEGF humano, en primer lugar, mediante la identificación sistemática de una genoteca de ADNc preparada a partir de células humanas, usando ADNc de VEGF bovino como una sonda de hibridación (Leung *et al.* (1989), *Science*, 246: 1306). Un ADNc identificado de este modo codifica una proteína de 165 aminoácidos que tiene más del 95% de homología con respecto a VEGF bovino; esta proteína de 165 aminoácidos típicamente se denomina VEGF humano (hVEGF) o VEGF<sub>165</sub>. La actividad mitógena de VEGF humano fue confirmada por medio de la expresión del ADNc de VEGF humano en células huéspedes mamíferas. Los medios acondicionados por células transfectadas con el ADNc de VEGF humano favorecieron la proliferación de células endoteliales capilares, mientras que las células de control no lo hicieron (Leung *et al.* (1989) *Science, supra*)).

Si bien pudo aislarse y purificarse un factor de crecimiento celular endotelial vascular a partir de fuentes naturales para el posterior uso terapéutico, las concentraciones relativamente bajas de la proteína en células foliculares y el alto costo, tanto en términos económicos como de esfuerzo, de la recuperación de VEGF demostraron ser comercialmente prohibitivos. En consecuencia, se acometieron otros esfuerzos para clonar y expresar VEGF por medio de técnicas de ingeniería genética (ver, por ejemplo, la referencia de Ferrara: *Laboratory Investigation*, 72: 615–618 (1995), y las referencias allí citadas).

VEGF es expresado en una diversidad de tejidos como múltiples formas homodímeras (121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos por monómero), resultantes del empalme de ARN alternativo. VEGF<sub>121</sub> es un mitógeno soluble que no se une a heparina; las formas más largas de VEGF se unen a heparina con afinidad progresivamente superior. Las formas de unión de heparina de VEGF pueden ser disociadas en el término carboxi por plasmina, de modo de liberar una o más formas de difusión de VEGF. El secuenciamiento de aminoácidos del péptido carboxi terminal identificado luego de la disociación de plasmina es Arg<sub>110</sub>–Ala<sub>111</sub>. La proteína amino terminal de “centro”, VEGF (1–110), aislada como un homodímero, se une a anticuerpos monoclonales neutralizantes (tales como los anticuerpos denominados 4.6.1 y 3.2E3.1.1) y formas solubles de receptores de VEGF con afinidad similar en comparación con el homodímero intacto VEGF<sub>165</sub>.

Se han identificado también recientemente varias moléculas estructuralmente relacionadas con VEGF, entre ellas, el factor de crecimiento placentario (PIGF, según su sigla en inglés), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E (Ferrara and Davis-Smyth (1987), *Endocr. Rev.*, *supra*; Ogawa *et al.* *J. Biological Chem.* 273: 31273–31281 (1998); Meyer *et al.* *EMBO J.*, 18: 363–374 (1999)). Se ha identificado una tirosina quinasa de receptor, Flt-4 (VEGFR-3), como el receptor para VEGF-C y VEGF-D (Joukov *et al.*, *EMBO. J.*, 15: 1751 (1996); Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1988–1992 (1996); Achen *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 548–553). Se ha demostrado que VEGF-C participa en la regulación de la angiogénesis linfática (Jeltsch *et al.*, *Science*, 276: 1423–1425 (1997)).

Se han identificado dos receptores de VEGFL: Flt-1 (también denominado VEGFR-1) y KDR (también denominado VEGFR-2) (Shibuya *et al.* (1990), *Oncogene*, 8: 519–527; de Vries *et al.* (1992), *Science*, 255: 989–991; Terman *et al.* (1992), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187: 1579–1586). Se ha demostrado que la neuropilina-1 es un receptor selectivo de VEGF, capaz de unirse a las isoformas de VEGF de unión de heparina (Soker *et al.* (1998), *Cell* 92: 735–45). Tanto Flt-1 como KDR pertenecen a la familia de tirosina quinasas de receptor (RTK, según su sigla en inglés). Las RTK comprenden una gran familia de receptores de transmembrana con diversas actividades biológicas. En la actualidad, se han identificado por lo menos diecinueve (19) subfamilias de RTK distintas. La familia de tirosina quinasas de receptor (RTK) incluye receptores que son cruciales para el crecimiento y la diferenciación de una diversidad de tipos celulares (Yarden and Ullrich (1988), *Ann. Rev. Biochem.*, 57: 433–478; Ullrich and Schlessinger (1990), *Cell*, 61: 243–254). La función intrínseca de las RTK es activada con la unión de ligando, lo que produce la fosforilación del receptor y múltiples sustratos celulares, y posteriormente, una diversidad de respuestas celulares (Ullrich & Schlessinger (1990), *Cell*, 61: 203–212). En consecuencia, la transducción de señal mediada por tirosina quinasa de receptor es iniciada por la interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando), habitualmente seguida de la dimerización de receptor, la estimulación de la actividad de tirosina quinasa de proteína intrínseca y la transfosforilación de receptor. Se crean así los sitios de unión para moléculas de transducción de señal intracelular que conducen a la formación de complejos con un espectro de moléculas de señalización citoplásmica que facilitan la apropiada respuesta celular (por ejemplo, la división celular, diferenciación, los efectos metabólicos, cambios

en el microentorno extracelular); ver la referencia de Schlessinger and Ullrich (1992), *Neuron* 9: 1–20. Estructuralmente, tanto Flt–1 como KDR tienen siete dominios de tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular, una sola región de transmembrana y una secuencia de tirosina quinasa de consenso que es interrumpida por un dominio de inserción de quinasa (Matthews *et al.* (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9026–9030; Terman *et al.* (1991), *Oncogene*, 6: 1677–1683.

(ii) *Anticuerpos anti-VEGF.*

Los anticuerpos anti-VEGF útiles en los métodos de la invención incluyen cualquier anticuerpo, o su fragmento de unión de antígeno, que se une con suficiente afinidad y especificidad a VEGF, y puede reducir o inhibir la actividad biológica de VEGF. 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 PIGF, PDGF o bFGF.

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos anti-VEGF incluyen, sin limitación, 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; un anticuerpo monoclonal recombinado humanizado anti-VEGF generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997), *Cancer Res.*, 57: 4593–4599. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF es “Bevacizumab (BV)”, también conocido como “VEGF rhuMAb” o “AVASTIN®”. Este anticuerpo comprende regiones de marco IgG1 humanas mutadas y regiones de determinación de complementariedad de unión de antígeno del anticuerpo monoclonal murino anti-hVEGF A.4.6.1, que bloquea la unión de VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente el 93% de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, que incluye la mayoría de las regiones de marco, deriva de IgG1 humano, y aproximadamente el 7% de la secuencia deriva del anticuerpo murino A4.6.1.

Bevacizumab y otros anticuerpos humanizados anti-VEGF se describen adicionalmente en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.884.879, concedida el 26 de febrero de 2005. Anticuerpos adicionales incluyen los anticuerpos de la serie G6 o B20 (por ejemplo, G6–31, B20–4.1), como se describen en la Publicación PCT Nro. WO 2005/012359; Publicación PCT Nro. WO 2005/044853; y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. 60/991.302, donde los contenidos de estas solicitudes de patente se incorporan expresamente en esta solicitud a modo de referencia. Para anticuerpos adicionales, ver las Patentes de los Estados Unidos Nros. 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020, 6.054.297; WO 98/45332; WO

96/30046; WO 94/10202; EP 0666868B1; Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nros. 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126; y la referencia de Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, 288: 149–164 (2004). Otros anticuerpos comprenden aquellos que se une a un epítipo funcional en VEGF humano que comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104; o alternativamente, que comprende los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

En una realización de la invención, el anticuerpo anti-VEGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW  
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP  
HYYGSSHWYF DWVGQGTLVT VSS (SEC. ID. NRO.: 1)

y una región variable de cadena liviana que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF  
TSSLHSGVPS RFGSGSGGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ  
GTKVEIKR (SEC. ID. NRO.: 2).

Un “anticuerpo de la serie G6”, de acuerdo con esta invención, es un anticuerpo anti-VEGF que deriva de una secuencia de un anticuerpo G6 o anticuerpo derivado de G6 de acuerdo con cualquiera de las Figuras 7, 24–26 y 34–35 de la Publicación PCT Nro. WO 2005/012359, cuya descripción total se incorpora expresamente en la presente solicitud a modo de referencia. Ver, además, la Publicación PCT Nro. WO 2005/044853, cuya descripción se incorpora expresamente en la presente solicitud a modo de referencia. En una realización, el anticuerpo de la serie G6 se une a un epítipo funcional en VEGF humano que comprende los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

Un “anticuerpo de la serie B20” de acuerdo con esta invención es un anticuerpo anti-VEGF que deriva de una secuencia del anticuerpo B20 o un anticuerpo derivado de B20 de acuerdo con cualquiera de las Figuras 27–29 de la Publicación PCT Nro. WO 2005/012359, cuya descripción total se incorpora expresamente en la presente solicitud a modo de referencia. Ver, además, Publicación PCT Nro. WO 2005/044853, y Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. 60/991.302, donde los contenidos de estas solicitudes de patente se incorporan expresamente en la presente solicitud a modo de referencia. En una

realización, el anticuerpo de la serie B20 se une a un epítipo funcional en VEGF humano que comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104.

Un "epítipo funcional" de acuerdo con esta invención se refiere a residuos de aminoácidos de un antígeno que contribuyen energéticamente a la unión de un anticuerpo. La mutación de cualquiera de los residuos de contribución energética del antígeno (por ejemplo, la mutación de VEGF de tipo silvestre por alanina o mutación homóloga) interrumpirá la unión del anticuerpo, de manera que la relación de afinidad relativa ( $IC_{50}$  VEGF mutante/ $IC_{50}$  VEGF de tipo silvestre) del anticuerpo será superior a 5 (ver el Ejemplo 2 del documento WO 2005/012359). En una realización, la relación de afinidad relativa se determina por medio de un ensayo ELISA de exhibición de fagos de unión de solución. Brevemente, se revisten inmunoplasmas de 96 receptáculos Maxisorp (NUNC) durante la noche, a 4°C, con una forma Fab del anticuerpo por ser ensayado, en una concentración de 2  $\mu$ g/ml en PBS, y se bloquean con PBS, 0,5% de BSA y 0,05% de Tween 20 (PBT), durante 2 h a temperatura ambiente. En primer lugar, se incuban diluciones sucesivas de mutantes puntuales de alanina de hVEGF de exhibición de fagos (forma residuos 8–109) o hVEGF de tipo silvestre (8–109) en PBT, en las placas revestidas con Fab, durante 15 min a temperatura ambiente, y las placas se lavan con PBS, 0,05% de Tween 20 (PBST). El fago ligado se detecta con un conjugado de peroxidasa de rábano rusticano de anticuerpo monoclonal anti-M13 (Amersham Pharmacia) diluido a 1:5000 en PBT, se desarrolla con sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) durante aproximadamente 5 min, se apaga con  $H_3PO_4$ , 1,0 M, y se lee en forma espectrofotométrica a 450 nm. La relación de valores  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$ , ala/ $IC_{50}$ , tipo silvestre) representa la cantidad de veces de reducción en la afinidad de unión (la afinidad de unión relativa).

(iii) *Moléculas de receptor de VEGF.*

Los dos receptores de VEGF mejor caracterizados son VEGFR1 (también conocido como Flt-1) y VEGFR2 (también conocido como KDR y FLK-1, para el homólogo murino). La especificidad de cada receptor para cada miembro de la familia de VEGF varía, si bien VEGF-A se une tanto a Flt-1 como a KDR. El receptor Flt-1 de longitud completa incluye un dominio extracelular que tiene siete dominios Ig, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular con actividad de tirosina quinasa. El dominio extracelular participa en la unión de VEGF, y el dominio intracelular participa en la transducción de señal.

Las moléculas de receptor de VEGF, o sus fragmentos, que se unen específicamente a VEGF pueden usarse en los métodos de la invención a fin de unir y secuestrar la proteína VEGF, de modo de evitar su señalización. En ciertas realizaciones, la molécula de receptor de VEGF, o su fragmento de unión de VEGF, es una forma soluble, tal como sFlt-1. Una forma soluble del receptor ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad biológica de la proteína VEGF, mediante la unión a VEGF, a fin de evitar su unión a sus receptores naturales presentes sobre la superficie de células blanco. Se incluyen además las proteínas de fusión de receptor de VEG, cuyos ejemplos se describen a continuación.

Una proteína de receptor de VEGF quimérica es una molécula de receptor que tiene secuencias de aminoácidos derivadas de por lo menos dos proteínas diferentes, por lo menos una de las cuales es una proteína de receptor de VEGF (por ejemplo, el receptor flt-1 o KDR), que es capaz de unirse a la actividad biológica de VEGF e inhibirla. En ciertas realizaciones, las proteínas de receptor de VEGF quiméricas de la invención consisten en secuencias de aminoácidos derivadas solo de dos diferentes moléculas de receptor de VEGF; sin embargo, las secuencias de aminoácidos que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o la totalidad de los siete dominios de tipo Ig de la región de unión de ligando extracelular del receptor flt-1 y/o KDR pueden ligarse a secuencias de aminoácidos de otras proteínas no relacionadas, por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina. Otras secuencias de aminoácidos a las cuales se combinan dominios de tipo Ig serán evidentes sin dificultad para los expertos en el arte. Ejemplos de proteínas de receptor de VEGF quiméricas incluyen, por ejemplo, Flt-1/Fc soluble, KDR/Fc, o FLT-1/KDR/Fc (también conocida como VEGF Trap) (ver, por ejemplo, Publicación de Solicitud PCT Nro. WO 97/44453).

Una proteína de receptor de VEGF soluble o proteínas de receptor de VEGF quiméricas de la invención incluyen proteínas de receptor de VEGF que no están fijadas a la superficie de células por medio de un dominio de transmembrana. De este modo, las formas solubles del receptor de VEGF, que incluyen proteínas de receptor quiméricas, que son capaces de unirse a VEGF e inactivarlo, no comprenden un dominio de transmembrana, y en consecuencia, generalmente no se asocian con la membrana celular de células en las cuales se expresa la molécula.

### **III. Usos terapéuticos.**

La invención provee un método de terapia complementaria que comprende la administración de un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un

anticuerpo anti-VEGF, a un sujeto, durante más de un año. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer colorrectal no metastásico. En algunas realizaciones del método, el antagonista específico de VEGF se administra luego de la cirugía definitiva. El sujeto tratado en esta invención se encuentra generalmente en riesgo de recurrencia del cáncer.

En algunas realizaciones, el método de terapia complementaria extiende la sobrevida libre de enfermedad (DFS) o la sobrevida general (OS) en el paciente. En algunas realizaciones, se evalúa la DFS o la OS, por ejemplo, se analiza alrededor de 2 a 5 años luego del inicio del tratamiento. Además, se provee un método de terapia complementaria que comprende la administración a un paciente con cáncer, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora el avance del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año. En algunas realizaciones, el avance del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF ha cesado. Además, la invención provee un método de terapia complementaria que comprende la administración a un paciente con cáncer, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora la recurrencia del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF dura más de un año. En algunas realizaciones, la recurrencia del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. En ciertas realizaciones, se administra al paciente el antagonista específico de VEGF luego de la cirugía definitiva. En ciertas realizaciones, la terapia complementaria que comprende la administración del anticuerpo anti-VEGF se continúa durante por lo menos 2 años, por lo menos 3 años, por lo menos 4 años, por lo menos 5 años, por lo menos 10 años o más luego del inicio del tratamiento.

La invención provee un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor primario, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, de manera de extender la DFS o la OS en el paciente, donde el antagonista específico de VEGF se administra durante más de un año. En algunas realizaciones, la DFS o la OS se evalúan, por ejemplo, se analizan, alrededor de 2 a 5 años luego del inicio del tratamiento. Además, se provee un método de terapia complementaria, que comprende la administración a

un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor primario, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora el avance del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año. En algunas realizaciones, el avance del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. La invención provee adicionalmente un método de terapia complementaria que comprende la administración a un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor primario, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora la recurrencia del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF dura más de un año. En algunas realizaciones, la recurrencia del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. En ciertas realizaciones, la terapia complementaria que comprende la administración del anticuerpo anti-VEGF se continúa durante por lo menos 2 años, por lo menos 3 años, por lo menos 4 años, por lo menos 5 años, por lo menos 10 años o más, luego del inicio del tratamiento.

La invención además provee un método de tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor primario, que comprende la administración al paciente, de terapia complementaria que comprende una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, de modo de extender la DFS o la OS en el paciente, donde el antagonista específico de VEGF se administra durante más de un año. En algunas realizaciones, se evalúa la DFS o la OS, por ejemplo, se analiza alrededor de 2 a 5 años luego del inicio del tratamiento. Se provee además un método de tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, de un tumor primario, que comprende la administración al paciente, de terapia complementaria que comprende una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora el avance del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año. En algunas realizaciones, el avance del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. La invención provee adicionalmente un método de tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer,

por ejemplo, de un tumor primario, que comprende la administración al paciente de terapia complementaria que comprende una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora la recurrencia del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF dura más de un año. En algunas realizaciones, la recurrencia del cáncer se previene o demora durante alrededor de 3, 4, 5 ó 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF. En ciertas realizaciones, el método comprende la administración del anticuerpo anti-VEGF durante por lo menos 2 años, por lo menos 3 años, por lo menos 4 años, por lo menos 5 años, por lo menos 10 años o más, luego del inicio del tratamiento.

Por ejemplo, un método puede comprender las siguientes etapas: a) una primera etapa que comprende una pluralidad de ciclos, donde cada ciclo comprende la administración, al sujeto, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab, y opcionalmente, por lo menos un agente quimioterapéutico, con un intervalo predeterminado; y b) una segunda etapa que comprende una pluralidad de ciclos, donde cada ciclo comprende la administración, al sujeto, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab, sin ningún agente quimioterapéutico con un intervalo predeterminado; donde las primera y segunda etapas combinadas duran por lo menos un año luego del tratamiento posoperatorio inicial. En algunas realizaciones, la primera y segunda etapas combinadas duran más de un año luego del tratamiento posoperatorio inicial. En algunas realizaciones, la segunda etapa dura más de 1 año, por lo menos 2 años, por lo menos 3 años, por lo menos 4 años, por lo menos 5 años o por lo menos 10 años luego del tratamiento posoperatorio inicial. En una realización, la primera etapa comprende una primera pluralidad de ciclos de tratamiento, donde se administran un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y un primer régimen quimioterapéutico, seguida de una segunda pluralidad de ciclos de tratamiento, donde se administran un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab, y un segundo régimen quimioterapéutico.

En un ejemplo, el método incluye la administración de FOLFOX6 modificado (oxaliplatino ( $85 \text{ mg/m}^2$ ) con leucovorina concurrente ( $400 \text{ mg/m}^2$ ) y 5-FU ( $400 \text{ mg/m}^2$ , bolo IV) el Día 1, y 5-FU ( $2400 \text{ mg/m}^2$ ) durante 46 horas el Día 1 y el Día 2), q 14 días durante 12 ciclos (6 meses) más bevacizumab administrado antes de

oxaliplatino el Día 1 de cada ciclo de quimioterapia (5 mg/kg IV), q 14 días durante 1 año o más.

En un programa de administración, la terapia complementaria de la invención comprende una primera etapa donde se administran a un paciente un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, y uno o más agentes quimioterapéuticos, en una pluralidad de ciclos de tratamiento; y una segunda etapa donde se usa un antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, como un único agente en una pluralidad de ciclos de mantenimiento. Cada ciclo de tratamiento consiste en una a tres semanas, de acuerdo con el plan de tratamiento particular. Por ejemplo, un ciclo de tratamiento puede incluir bevacizumab como el antagonista específico de VEGF, y puede durar tres semanas, lo que significa que los pacientes reciben una dosis de quimioterapia y una dosis de bevacizumab cada tres semanas. Un ciclo de tratamiento además puede durar dos semanas, lo que significa que los pacientes reciben una dosis de quimioterapia y una dosis de bevacizumab, cada dos semanas. La primera etapa de tratamiento entera puede durar alrededor de 4–12 ciclos. Durante la segunda etapa de mantenimiento, puede suministrarse bevacizumab cada dos semanas o cada tres semanas, de acuerdo con la duración del ciclo particular, y durante un total de alrededor de 10–50 ciclos. En ciertas realizaciones, la terapia complementaria dura por lo menos un año desde el inicio del tratamiento (por ejemplo, el tratamiento posoperatorio inicial), y se seguirá el avance del sujeto después de ese tiempo. En algunas realizaciones, la terapia complementaria de anticuerpo anti-VEGF dura más de 1 año, por lo menos 2 años, por lo menos 3 años, por lo menos 4 años, por lo menos 5 años o por lo menos 10 años desde el inicio del tratamiento, o dura hasta la muerte.

De acuerdo con el tipo y la gravedad de la enfermedad, las dosificaciones preferidas para el anticuerpo anti-VEGF se encuentran en el rango de aproximadamente 1 ug/kg a aproximadamente 50 mg/kg, con mayor preferencia, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, lo que incluye, sin limitación, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. En algunos aspectos, el régimen quimioterapéutico involucra la administración intermitente de alta dosis tradicional. En algunos otros aspectos, los agentes quimioterapéuticos se administran usando dosis menores y más frecuentes, sin descansos programados (“quimioterapia metronómica”). El avance de la terapia de la invención se controla fácilmente por medio de ensayos y técnicas convencionales.

La administración del anticuerpo y la quimioterapia puede disminuir la probabilidad de recurrencia de la enfermedad (recurrencia del cáncer en el órgano

primario, o recurrencia distante), en un paciente de cáncer, en comparación con los sujetos tratados solo con quimioterapia (por ejemplo, leucovorina, oxaliplatino, 5-FU, irinotecano o sus combinaciones).

En un aspecto, la invención provee un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente con cáncer, luego de la cirugía definitiva, de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF, de manera de extender la sobrevida libre de enfermedad (DFS) o la sobrevida general (OS) en el paciente. La DFS o la OS pueden evaluarse, por ejemplo, analizarse, alrededor de 2 a 5 años luego del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones, la DFS o la OS se evalúa, por ejemplo, se analiza, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 años luego del inicio del tratamiento. La invención además provee un método de prevención de recurrencia del cáncer en un paciente, que comprende la administración al paciente, de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF, donde dicha administración del anticuerpo anti-VEGF previene la recurrencia del cáncer. Asimismo, la invención provee un método de disminución de la probabilidad de recurrencia del cáncer en un paciente, que comprende la administración al paciente, de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF, donde dicha administración del anticuerpo anti-VEGF disminuye la probabilidad de recurrencia del cáncer. En algunas realizaciones de los métodos de la invención, dicha administración del antagonista específico de VEGF previene o reduce la probabilidad de aparición de un tumor clínicamente detectable o su metástasis.

Para la terapia complementaria, el antagonista específico de VEGF puede administrarse en una cantidad, o durante un tiempo (por ejemplo, para un régimen de terapéutico particular en función del tiempo), de manera de tal de reducir (por ejemplo, el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) o inhibir la metástasis tumoral; reducir o inhibir el crecimiento tumoral o la proliferación de células tumorales; reducir o prevenir el crecimiento de un tumor latente; reducir o prevenir el crecimiento o la proliferación de micrometástasis; reducir o prevenir el nuevo crecimiento de un tumor, luego del tratamiento o la remoción; y/o aliviar hasta cierto alcance uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

El antagonista específico de VEGF se administra generalmente luego de un período de tiempo durante el cual el sujeto se ha recuperado de la cirugía. Este período de tiempo puede comprender el período necesario para la curación de la herida o la curación de la incisión quirúrgica; el período de tiempo necesario para reducir el riesgo de dehiscencia de la herida; o el período de tiempo necesario para el retorno del sujeto a un estado de salud esencialmente similar o mejor al

estado de salud antes de la cirugía. El período entre la terminación de la cirugía definitiva y la primera administración del antagonista específico de VEGF también puede incluir el período necesario para un descanso del fármaco, donde el sujeto requiere o solicita un período de tiempo entre los regímenes terapéuticos. En general, el período de tiempo entre la terminación de la cirugía definitiva y el comienzo de la terapia con el antagonista específico de VEGF puede comprender menos de 1 semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas (28 días), 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años, 3 años o más. En una realización, el período de tiempo entre la cirugía definitiva y la administración del antagonista específico de VEGF es superior a 2 semanas e inferior a 1 año.

En un ejemplo, el antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, se administra en una cantidad eficaz para extender la sobrevida libre de enfermedad (DFS) o la sobrevida general (OS). La DFS o la OS pueden evaluarse, por ejemplo, analizarse, alrededor de 2 a 5 años luego de una administración inicial del anticuerpo. En ciertas realizaciones, la DFS o la OS del sujeto se evalúa, por ejemplo, se analiza, alrededor de 3–5 años, alrededor de 4–5 años, o por lo menos alrededor de 4, por lo menos alrededor de 5 años luego del inicio del tratamiento, o luego del diagnóstico inicial.

El antagonista específico de VEGF puede administrarse como un único agente. La invención además caracteriza el uso de una combinación de por lo menos un antagonista específico de VEGF con una o más terapias adicionales contra el cáncer. Ejemplos de terapias contra el cáncer incluyen, sin limitación, la cirugía, terapia de radiación (radioterapia), bioterapia, inmunoterapia, quimioterapia, o una combinación de estas terapias. Además, pueden usarse agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos y agentes antiproliferativos en combinación con el antagonista específico de VEGF.

En ciertos aspectos, el antagonista específico de VEGF se usa en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos para la terapia complementaria en el tratamiento de cáncer colorrectal, luego de la cirugía definitiva. Pueden usarse una diversidad de agentes quimioterapéuticos, en los métodos de tratamiento combinados de la invención. Una lista ejemplar y no limitativa de agentes quimioterapéuticos contemplados se provee en esta solicitud en la sección de "Definiciones", o se describen en esta solicitud.

En un ejemplo, la invención caracteriza el uso de un antagonista específico de VEGF con uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, un cóctel). En algunas realizaciones donde el cáncer es cáncer colorrectal, el agente quimioterapéutico puede ser aquel específicamente utilizado para el cáncer colorrectal, e incluye, sin limitación, leucovorina, 5-fluoruracilo, oxaliplatino, irinotecano o combinaciones de dos o más de dichos agentes quimioterapéuticos. La administración combinada contempla la administración simultánea, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde, preferentemente, se presenta un período de tiempo donde ambos agentes activos (o todos) ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. La preparación y los programas de dosis para dichos agentes quimioterapéuticos pueden ser aquellos de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, o según lo determinado empíricamente por el médico experto. La preparación y los programas de dosis para la quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del antagonista específico de VEGF, o puede proporcionarse en forma simultánea con dicha administración.

La administración combinada incluye la administración conjunta o concurrente, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde, opcionalmente, se presenta un período de tiempo donde ambos agentes activos (o todos) ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. En consecuencia, el agente quimioterapéutico puede administrarse antes o después de la administración del antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF. En esta realización, el tiempo entre por lo menos una administración del agente quimioterapéutico y por lo menos una administración del antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, preferentemente, es de alrededor de 1 mes o menos, y con mayor preferencia, de alrededor de 3 semanas, 2 semanas o menos. Alternativamente, el agente quimioterapéutico y el anticuerpo anti-VEGF se administran al paciente en forma concurrente, en una sola formulación o en formulaciones separadas. El tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico (por ejemplo, leucovorina, oxaliplatino, 5-FU, irinotecano o sus combinaciones) y el anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab) puede lograr un beneficio terapéutico sinérgico, o mayor que el aditivo, para el paciente.

Si se administra, el agente quimioterapéutico habitualmente se suministra en dosificaciones conocidas para dicho agente, o en forma opcional, menores, dada la acción combinada de los fármacos, o los efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolito. La preparación y los programas de dosis para dichos agentes quimioterapéuticos pueden ser de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, o según lo determinado empíricamente por el médico experto.

En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia de combinación contra el tumor con el anticuerpo anti-VEGF de la invención incluyen antagonista de otros factores que participan en el crecimiento tumoral, tales como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2) ErbB3, ErbB4, o TNF. A veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente. En una realización preferida, el anticuerpo anti-VEGF es administrado en forma conjunta con un agente citotóxico o inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, puede administrarse en primer lugar el agente citotóxico o inhibidor del crecimiento, seguido del anticuerpo anti-VEGF. Sin embargo, se contemplan también la administración simultánea o la administración del anticuerpo anti-VEGF en primer lugar. Las dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas utilizadas actualmente, y pueden reducirse dada la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo anti-VEGF.

La formulación de la presente invención además puede contener más de un compuesto activo según lo necesario para la indicación particular tratada, preferentemente, aquellos que tienen actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser conveniente proporcionar adicionalmente anticuerpos que se unen a EGFR, VEGF (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un epítipo diferente en VEGF), VEGFR, o ErbB2 (por ejemplo, Herceptin®) en la formulación. Alternativa o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, una citoquina, un inhibidor del crecimiento o un antagonista de VEGFR de molécula pequeña. Dichas moléculas se presentan adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito propuesto.

En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia de combinación contra el cáncer con el anticuerpo de la invención incluyen otros agentes antiangiogénicos. Se han identificado muchos agentes antiangiogénicos, que son conocidos en el arte, entre ellos, aquellos citados por Carmeliet y Jain,

*Nature*, 407 (6801): 249–57 (2000). Preferentemente, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se usa en combinación con otro antagonista de VEGF o con un antagonista del receptor de VEGF tal como variantes de VEGF, fragmentos de receptor de VEGF solubles, aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR neutralizantes, inhibidores de bajo peso molecular de tirosina quinasas de VEGFR, y sus combinaciones. Alternativa o adicionalmente, pueden administrarse en forma conjunta al paciente dos o más anticuerpos anti-VEGF.

Para la terapia complementaria, la dosificación apropiada de antagonista específico de VEGF puede depender del tipo de enfermedad por tratar, como se define anteriormente, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de la terapia previa, los antecedentes clínicos del paciente y su respuesta al antagonista específico de VEGF, y el criterio del médico de atención. El antagonista específico de VEGF puede ser administrado adecuadamente al paciente en una sola vez, o durante una serie de tratamientos. En un régimen de terapia de combinación, el antagonista específico de VEGF y uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o sinérgica. De acuerdo con esta solicitud, una cantidad terapéuticamente eficaz es aquella de modo tal que la administración conjunta de un antagonista específico de VEGF y uno o más agentes terapéuticos adicionales, o la administración de una composición de la invención, logra la reducción o inhibición del cáncer, como se describe con anterioridad. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es aquella cantidad de un antagonista específico de VEGF y uno o más agentes terapéuticos adicionales, necesaria para prevenir sinérgica o significativamente la recurrencia del cáncer.

El antagonista específico de VEGF y uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse en forma simultánea o sucesiva, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o eliminar la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor latente o de micrometástasis. El antagonista específico de VEGF y uno más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse como terapia de mantenimiento, a fin de prevenir o reducir la probabilidad de recurrencia del tumor.

Como será entendido por aquellos expertos en el arte, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos u otros agentes antineoplásicos serán generalmente aquellas aproximadas a las ya empleadas en terapias clínicas, por ejemplo, donde los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en

combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Probablemente, se produzcan variaciones en la dosificación conforme a la afección tratada. El médico que administra el tratamiento podrá determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a la terapia de radiación.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF administrado es un anticuerpo desnudo, intacto. Sin embargo, el anticuerpo anti-VEGF puede estar conjugado con un agente citotóxico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo conjugado y/o antígeno al cual se une son internalizados por la célula, para lograr la mayor eficacia terapéutica del conjugado para producir la muerte de la célula neoplásica a la cual se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige al ácido nucleico en la célula neoplásica, o interfiere con dicho ácido nucleico. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

#### **IV. Dosificaciones y duración.**

La composición de antagonista específico de VEGF será formulada, dosificada y administrada de manera consecuente con las buenas prácticas médicas. Los factores por considerar en este contexto incluyen el trastorno particular tratado, el sujeto particular tratado, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de liberación del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del antagonista específico de VEGF por ser administrado será gobernada por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, tratar o estabilizar una neoplasia benigna, precancerosa, o un cáncer en etapa temprana; o para tratar o prevenir la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor latente, o de micrometástasis, por ejemplo, en el contexto neocomplementario o complementario. El antagonista específico de VEGF no necesariamente es formulado con uno o más agentes actualmente utilizados para la prevención o el tratamiento del cáncer, o del riesgo de la manifestación de cáncer, si bien, opcionalmente, es formulado con dichos agentes. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de antagonista específico de VEGF presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores mencionados con anterioridad. Estos agentes se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con las mismas vías de administración que las utilizadas

anteriormente, o desde alrededor de 1 hasta 99% de las dosificaciones empleadas anteriormente.

De acuerdo con el tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1  $\mu\text{g/kg}$  a 100  $\text{mg/kg}$  (por ejemplo, 0,1–20  $\text{mg/kg}$ ) de antagonista específico de VEGF es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, ya sea mediante la infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1  $\mu\text{g/kg}$  a aproximadamente 100  $\text{mg/kg}$  o más, de acuerdo con los factores mencionados con anterioridad. Las dosificaciones particularmente convenientes incluyen, por ejemplo, 7,5  $\text{mg/kg}$ , 10  $\text{mg/kg}$  y 15  $\text{mg/kg}$ . Para administraciones repetidas durante varios días o períodos más largos, de acuerdo con la afección, el tratamiento se sostiene hasta que el cáncer es tratado, según lo medido por los métodos descritos con anterioridad o conocidos en el arte. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. En un ejemplo, si el antagonista específico de VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo de la invención se administra una vez por semana, cada dos semanas, o cada tres semanas, en un rango de dosis de aproximadamente 5  $\text{mg/kg}$  a aproximadamente 15  $\text{mg/kg}$ , lo que incluye, sin limitación, 7,5  $\text{mg/kg}$  o 10  $\text{mg/kg}$ . El avance de la terapia de la invención se controla con facilidad por medio de ensayos y técnicas convencionales.

La duración de la terapia continuará durante tanto tiempo como sea indicado por el médico, o hasta lograr un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, los efectos descritos en esta solicitud). En algunas realizaciones, la terapia se continúa durante más de un año. En ciertas realizaciones, la terapia de antagonista específico de VEGF se continúa durante 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, o durante un período de años que abarcan toda la vida del sujeto. En algunas realizaciones, la terapia se continúa hasta el avance de la enfermedad. En algunas realizaciones, la terapia se continúa en ausencia de recurrencia de la enfermedad.

Los antagonistas específicos de VEGF de la invención se administran a un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo, o la infusión continua durante un período de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Se desea en particular la administración local si se asocian toxicidad o efectos secundarios prolongados con el antagonismo de VEGF. Puede

usarse también una estrategia *ex vivo* para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* suponen la transfección o transducción de células obtenidas del sujeto, con un polinucleótido que codifica un antagonista de VEGF. Las células transfectadas o transducidas entonces son retornadas al sujeto. Las células pueden ser cualesquiera de una amplia gama de estirpes, que incluyen, sin limitación, células hematopoyéticas (por ejemplo, células de la médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células T, o células B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células del músculo.

Por ejemplo, si el antagonista específico de VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo se administra por cualquier medio, por ejemplo, la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo es administrado adecuadamente mediante la infusión por pulsos, en particular, con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación se suministra mediante inyecciones, con mayor preferencia, inyecciones intravenosas o subcutáneas, de acuerdo, en parte, con el tipo de administración, a decir, breve o crónica.

En otro ejemplo, el compuesto antagonista específico de VEGF se administra en forma local, por ejemplo, mediante inyecciones directas, cuando el trastorno o la ubicación del tumor lo permiten, y las inyecciones pueden repetirse periódicamente. El antagonista específico de VEGF también puede suministrarse en forma sistémica al sujeto, o directamente a las células tumorales, por ejemplo, a un tumor o un lecho tumoral luego de la escisión quirúrgica del tumor, a fin de prevenir o reducir la recurrencia local o la metástasis, por ejemplo, de un tumor latente o de micrometástasis.

Alternativamente, puede suministrarse una molécula de ácido nucleico inhibitoria o un polinucleótido que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un antagonista específico de VEGF, a las células apropiadas en el sujeto. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico puede dirigirse al tumor en sí mismo.

El ácido nucleico puede ser introducido en las células por cualquier medio apropiado para el vector empleado. Muchos de dichos métodos son bien conocidos en el arte (Sambrook *et al.*, *supra*, y Watson *et al.*, *Recombinant DNA, Chapter 12, 2d edition*, Scientific American Books, 1992). Ejemplos de métodos de suministro de genes abarcan la transfección mediada por liposomas, la

electroporación, los métodos de fosfato de calcio/DEAE dextrano, la pistola de genes y la microinyección.

#### **V. Formulaciones farmacéuticas.**

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos utilizados de acuerdo con la presente invención se preparan usando métodos convencionales conocidos en el arte, por ejemplo, mediante la mezcla del anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza, con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences, (20th edition)*, ed. A. Gennaro, 2000; Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), 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 octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; 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). Las formulaciones de anticuerpos anti-VEGF liofilizadas preferidas se describen en el documento WO 97/04801, expresamente incorporado en la presente solicitud a modo de referencia. Opcional, si bien preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, típicamente, por ejemplo, cloruro de sodio, y preferentemente, en concentraciones aproximadamente fisiológicas. De manera opcional, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la concentración del conservante varía de 0,1 a 2,0%, típicamente, v/v. Los conservantes adecuados incluyen aquellos conocidos en las artes farmacéuticas. Ejemplos de conservantes son alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno.

Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden comprender un surfactante farmacéuticamente aceptable, en una concentración de 0,005 a 0,02%.

En una realización, se provee bevacizumab para usos terapéuticos en viales de un solo uso, libres de conservante, de 100 mg y 400 mg, a fin de suministrar 4 ml o 16 ml de bevacizumab (25 mg/ml). El producto de 100 mg puede formularse en 240 mg de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dehidrato, 23,2 mg de fosfato de sodio (monobásico, monohidrato), 4,8 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhidro), 1,6 mg de polisorbato 20, y agua para inyección, USP. El producto de 400 mg puede formularse en 960 mg de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dehidrato, 92,8 mg de fosfato de sodio (monobásico, monohidrato), 19,2 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhidro), 6,4 mg de polisorbato 20 y agua para inyección, USP.

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 anticuerpos que se unen a EGFR, VEGF (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un epítipo diferente en VEGF), VEGFR, o ErbB2 (por ejemplo, Herceptin®) en la formulación. Alternativa o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento o un antagonista de VEGFR de molécula pequeña. Dichas moléculas se presentan adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito propuesto.

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, 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  $\gamma$  etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Si bien los polímeros tales como acetato de etilenvinilo 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 un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o formar agregados 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 utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra sin dificultad mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

#### **VI. Eficacia del tratamiento.**

La presente invención provee métodos de terapia complementaria en pacientes de cáncer, donde el tratamiento produce efectos beneficiosos contra el cáncer, sin causar toxicidad o efectos adversos significativos. La eficacia del tratamiento de la invención puede medirse mediante diversos criterios de valoración comúnmente utilizados en la evaluación de los tratamientos contra el cáncer, por ejemplo, sin limitación, la duración de la sobrevida, la sobrevida libre de enfermedad, la sobrevida libre de avance, el tiempo hasta el avance de la enfermedad, el tiempo en remisión y la calidad de vida. Debido a que los agentes antiangiogénicos de la invención se dirigen a la vasculatura del tumor 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 las respuestas clínicas a los fármacos de carácter único. El

anticuerpo anti-VEGF de la invención puede causar la inhibición de la diseminación metastásica, o puede simplemente ejercer un efecto oncoestático. En consecuencia, deben emplearse nuevos enfoques para la determinación de la eficacia de una terapia antiangiogénica, 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.

En una realización, la presente invención provee métodos de prevención o disminución de la probabilidad de recurrencia del cáncer en un paciente humano.

En un ejemplo, el antagonista específico de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, se administra en una cantidad eficaz para extender la DFS o la OS, donde la DFS o la OS se evalúa, por ejemplo, se analiza, alrededor de 2 a 5 años luego de la administración inicial del anticuerpo. En ciertas realizaciones, la DFS o la OS del sujeto se evalúa, por ejemplo, se analiza, alrededor de 3–5 años, alrededor de 4–5 años, o por lo menos alrededor de 4, o por lo menos alrededor de 5 años, o por lo menos alrededor de 6 años, o por lo menos alrededor de 7 años, o por lo menos alrededor de 8 años, o por lo menos alrededor de 9 años, o por lo menos alrededor de 10 años luego del inicio del tratamiento o luego del diagnóstico inicial.

En una realización, los métodos de la presente invención pueden usarse para aumentar la duración de la sobrevida de un sujeto sensible a un tipo de cáncer o a la recurrencia del cáncer, o diagnosticado con un cáncer o una recurrencia del cáncer. La duración de la sobrevida se define como el tiempo desde la primera administración del fármaco hasta la muerte. La duración de la sobrevida también puede medirse por medio de la relación de riesgo estratificada (HR, según su sigla en inglés) del grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control, que representa el riesgo de muerte para un paciente durante el tratamiento.

En una otra realización, el tratamiento de la invención aumenta significativamente el índice de respuesta en un grupo de sujetos, por ejemplo, pacientes humanos, sensibles a un tipo de cáncer o diagnosticados con un tipo de cáncer, que son tratados con diversas terapias antineoplásicas. El índice de respuesta se define como el porcentaje de pacientes tratados que han respondido al tratamiento. En un aspecto, el tratamiento de combinación de la invención usando un anticuerpo anti-VEGF y cirugía, terapia de radiación, o uno o más agentes quimioterapéuticos incrementa de manera significativa el índice de

respuesta en el grupo de pacientes tratados, en comparación con el grupo tratado con cirugía, terapia de radiación o quimioterapia sola.

## **VII. Producción de anticuerpos.**

### **(i) Anticuerpos policlonales.**

Preferentemente, los anticuerpos policlonales se producen en animales por medio de inyecciones múltiples subcutáneas (s. c.) o intraperitoneales (i. p.) del antígeno pertinente y un coadyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína inmunógena en la especie por ser inmunizada, por ejemplo, hemocianina de lapa, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivador, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación mediante residuos cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$  o  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , donde R y  $\text{R}^1$  son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunógenos o derivados, combinando, por ejemplo, 100  $\mu\text{g}$  o 5  $\mu\text{g}$  de la proteína o el conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de coadyuvante completo de Freund, e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales son reforzados con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en coadyuvante completo de Freund, mediante la inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a catorce días después, se toma una muestra de sangre de los animales, y se ensaya el suero a fin de determinar la valoración de anticuerpo. Se refuerza a los animales hasta que la valoración se estabiliza. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, aunque conjugado con una proteína diferente o a través de un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los conjugados además pueden elaborarse en cultivo de células recombinadas como fusiones de proteínas. Además, se utilizan convenientemente agentes de agregación, tales como alumbre, a fin de aumentar la respuesta inmunitaria.

### **(ii) Anticuerpos monoclonales.**

Pueden obtenerse en el arte diversos métodos para la preparación de anticuerpos monoclonales de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando el método de hibridoma, que fue descrito por primera vez por Kohler *et al*, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ingeniería genética (Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal

como un hámster o macaco, es inmunizado tal como se describe anteriormente, a fin de producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos entonces son fusionados con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, a fin de formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59–103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado, que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma progenitoras, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma progenitoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT, según su sigla en inglés), el medio de cultivo para los hibridomas habitualmente comprenderá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), donde estas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, que sostienen la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y que son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, las estirpes celulares de mieloma preferidas son las estirpes de mieloma murinas, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC–21 y MPC–11, que pueden obtenerse en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California U. S. A, y células SP–2 o X63–Ag8–653, que pueden obtenerse en la Colección de Cultivos de Tipo Norteamericano (American Type Culture Collection), Rockville, Maryland, U. S. A. Las estirpes de células de heteromieloma de ratón–humano y de mieloma humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51–63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual crecen las células de hibridoma es ensayado a fin de evaluar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma mediante 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).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad o actividad deseada, los clones pueden ser subclonados mediante la limitación de los procedimientos de dilución, y cultivados por medio de métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59–103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito abarcan, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo*, como tumores de ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones son adecuadamente separados del medio de cultivo, líquido ascítico o suero, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN codificador de los anticuerpos monoclonales es aislado fácilmente y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse de manera específica a genes codificadores de las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, los que luego son transfectados en células huéspedes tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, a fin de sintetizar anticuerpos monoclonales en dichas células huéspedes recombinadas. La producción biotecnológica de anticuerpos se describirá en más detalle a continuación.

En otra realización, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de genotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en la referencia de McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552–554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352, 624–628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581–597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando genotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) mediante la mezcla de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779–783 (1992)), al igual que la infección de combinación y la recombinación *in vivo* como una estrategia para la construcción de genotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265–2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables para las técnicas de hibridomas de anticuerpos

monoclonales tradicionales, para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, reemplazando con la secuencia codificadora para los dominios constantes de cadena pesada y liviana humanos, las secuencias murinas homólogas (Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificadora de inmunoglobulina, toda la secuencia codificadora para un polipéptido no inmunoglobulina, o parte de ella.

Habitualmente, se sustituyen con dichos polipéptidos no inmunoglobulina los dominios constantes de un anticuerpo, o los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo, a fin de crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno, y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados y humanos.

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos, desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que, habitualmente, se toman de un dominio variable de "importación". La humanización puede efectuarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522–525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332: 323–327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534–1536 (1988)), mediante la sustitución de las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano, con secuencias de CDR o CDR de roedor. Por lo tanto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567), donde una cantidad sustancialmente menor que un dominio variable humano intacto ha sido reemplazada por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados habitualmente son anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de CDR, y posiblemente algunos residuos de FR, son sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto livianos como pesados, para ser utilizados en la producción de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Conforme al así denominado método de "mejor adaptación", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor es sometida a la identificación sistemática contra la genoteca entera de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que se

encuentra más cerca de la del roedor entonces es aceptada como la región de marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método emplea una región de marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas livianas o pesadas. Puede usarse el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Además, es importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad para el antígeno, y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, conforme a un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y diversos productos humanizados definidos, usando modelos tridimensionales de las secuencias progenitora y humanizada. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales pueden obtenerse comúnmente, y son conocidos por los expertos en el arte. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y exhiben probables estructuras de conformación tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del posible rol de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que tienen influencia sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar desde el receptor y las secuencias de importación, de manera de lograr las características del anticuerpo deseadas, tales como la mayor afinidad para el antígeno o los antígenos blanco. En general, los residuos de CDR están directa y sustancialmente comprometidos en la influencia sobre la unión de antígeno.

Los anticuerpos anti-VEGF humanizados y sus variantes de maduración para afinidad se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.884.879, concedida el 26 de febrero de 2005.

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, con la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. A modo de ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo ( $J_H$ ) en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos logra la completa inhibición de la producción de

anticuerpo endógeno. La transferencia de la gama de gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal logrará la producción de anticuerpos humanos luego del desafío de antígeno. Ver, por ejemplo, las referencias de Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255–258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); y Duchosal *et al.*, *Nature*, 355: 258 (1992).

Alternativamente, puede emplearse la tecnología de exhibición de fagos (McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552–553 (1990)) a fin de producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Conforme a esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo son clonados en marco en un gen de proteína de membrana menor o mayor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y exhibidos como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de filamento simple del genoma de fago, las selecciones sobre la base de las propiedades funcionales del anticuerpo también logran la selección del gen codificador del anticuerpo que exhibe dichas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La exhibición de fagos puede efectuarse en una variedad de formatos, reseñados, por ejemplo, en la referencia de Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology*, 3: 564–571 (1993). Pueden utilizarse varias fuentes de segmentos de genes V para la exhibición de fagos. Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624–628 (1991) aislaron una diversa gama de anticuerpos antioxazolona de una pequeña genoteca de combinación aleatoria de genes V derivados del bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados, y pueden aislarse anticuerpos para una diversa gama de antígenos (entre ellos, autoantígenos), esencialmente siguiendo las técnicas descriptas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581–597 (1991), o Griffith *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725–734 (1993). Ver, además, Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.565.332 y 5.573.905.

Como se describe anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas *in vitro* (ver Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.567.610 y 5.229.275).

Los anticuerpos anti-VEGF monoclonales humanos se describen en la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.730.977, concedida el 24 de marzo de 1998.

(iv) Fragmentos de anticuerpos.

Se han ideado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos eran derivados mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, las referencias de Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24: 107–117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden ser producidos directamente por células huéspedes recombinadas. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. De modo alternativo, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente a fin de formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 163–167 (1992)). Conforme a otro enfoque, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente a partir de cultivo de células huéspedes recombinadas. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en el arte. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Ver el documento WO 93/16185.

(vi) Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos.

Se contemplan las modificaciones de secuencias de aminoácidos de antagonistas de los anticuerpos que se describen en esta solicitud. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones y sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se efectúa cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para lograr la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraducción del anticuerpo, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o ciertas regiones del anticuerpo, que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis, se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", como lo describen Cunningham y Wells, *Science*, 244: 1081–1085 (1989). Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos blanco (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan con un aminoácido cargado negativamente o neutro (con mayor preferencia, alanina o polialanina), a fin de afectar la interacción de los

aminoácidos con el antígeno. Aquellas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones entonces se refinan mediante la introducción de variantes adicionales u otras variantes, en los sitios de sustitución, o en lugar de ellos. En consecuencia, si bien el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos es predeterminado, no es necesario predeterminar la naturaleza de la mutación *per se*. Por ejemplo, a fin de analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se efectúa la mutagénesis aleatoria o de barrido ala en la región o el codón blanco, y las variantes de anticuerpo expresadas se someten a identificación sistemática para detectar la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- o carboxilo-terminales cuya longitud varía desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, al igual que inserciones de intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal, o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión, al término N o C del anticuerpo, de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, aunque también se contemplan las alteraciones de FR.

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se efectúan seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del espinazo del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o una conformación helicoidal; (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio blanco; o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en la referencia de A. L. Lehninger, *Biochemistry*, segunda edición pp. 73–75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M);

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q);

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E);

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H).

Alternativamente, los residuos naturales pueden dividirse en grupos sobre la base de propiedades de cadenas laterales comunes:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que 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.

También puede sustituirse cualquier residuo de cisteína no involucrado en el mantenimiento de la apropiada conformación del anticuerpo, en general, con serina, a fin de mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento anormal. De modo inverso, pueden agregarse enlaces de cisteína al anticuerpo, a fin de mejorar su estabilidad (en particular, cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución supone la sustitución de uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo progenitor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán mejores propiedades biológicas en relación con el anticuerpo progenitor a partir del cual son generadas. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución es la maduración para afinidad usando exhibición de fagos. En resumen, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6–7 sitios) a fin de generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se exhiben en una forma monovalente desde partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto de gen III de M13 insertado dentro de cada partícula. Las variantes exhibidas por fagos entonces se someten a la identificación sistemática a fin de establecer su actividad biológica (por ejemplo, la afinidad de unión), como se describe en esta solicitud. Con la finalidad de identificar los sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, puede efectuarse la mutagénesis de barrido de alanina, de modo de identificar los residuos de región hipervariable que contribuyen de manera significativa a la unión de antígeno. Alternativamente, o además, puede

ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo, de manera de identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el VEGF humano. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en esta solicitud. Una vez que dichas variantes son generadas, el grupo de variantes se somete a la identificación sistemática como se describe en esta solicitud, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes pueden seleccionarse para mayor desarrollo.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. La alteración quiere decir la deleción de una o más porciones de carbohidrato halladas en el anticuerpo, o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos habitualmente es N-ligada u O-ligada. La N-ligación se refiere a la adhesión de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la adhesión enzimática de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. En consecuencia, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación O-ligada se refiere a la adhesión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un hidroxiaminoácido, más comúnmente, serina o treonina, si bien también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo de modo conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera de contener una o más de las secuencias de tripéptido que se describen anteriormente (para sitios de glicosilación N-ligados). La alteración también puede llevarse a cabo mediante la adición o la sustitución de uno o más residuos serina o treonina, en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación O-ligados).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a dicho anticuerpo puede ser alterado. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. US 2003/0157108 A1, Presta, L. Ver, además, US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina de bisección

(GlcNAc) en el carbohidrato, unida a una región Fc del anticuerpo son mencionados en el documento WO 03/011878, en la referencia de Jean-Mairet *et al.* y en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.602.684, Umana *et al.* Los anticuerpos con por lo menos un residuo galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se informan en el documento WO 97/30087, Patel *et al.* Ver, además, el documento WO 98/58964 (Raju, S.) y el documento WO 99/22764 (Raju, S.), que se refieren a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a su región Fc.

Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, de manera de aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC), o complementar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, pueden introducirse residuos cisteína en la región Fc, a fin de permitir la formación de enlace de disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodímero generado de este modo puede tener mayor capacidad de internalización, y mayores 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, B., *J. Immunol.*, 148: 2918–2922 (1992). Los anticuerpos homodímeros con mayor actividad antitumoral pueden prepararse también usando entrecruzadores heterobifuncionales, según 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 de esta manera, pueda tener mayor lisis de complemento y capacidades de ADCC. Ver la referencia de Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219–230 (1989).

El documento WO 00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con mayor función ADCC en presencia de células efectoras humanas, donde los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en su región Fc. Preferentemente, el anticuerpo con mayor ADCC comprende sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos EU). Preferentemente, la región Fc alterada es una región Fc de IgG1 humana que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones. Dichas sustituciones son opcionalmente combinadas con sustituciones que aumentan la unión de C1q y/o la CDC.

Los anticuerpos con alterada unión de C1q y/o citotoxicidad dependiente de

complemento (CDC) se describen en los documentos WO 99/51642, Patente de los Estados Unidos Nro. 6.194.551B1, Patente de los Estados Unidos Nro. 6.242.195B1, Patente de los Estados Unidos Nro. 6.528.624B1 y Patente de los Estados Unidos Nro. 6.538.124 (Idusogie *et al.*). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y 334 de su región Fc (numeración de residuos EU).

A fin de aumentar la semivida sérica del anticuerpo, puede incorporarse un epítipo de unión de receptor de rescate en el anticuerpo (en especial, un fragmento de anticuerpo), como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 5 739 277. Conforme a esta solicitud, el término "epítipo de unión de receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>), responsable del aumento de la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

Los anticuerpos con mayores semividas y mejor unión al receptor Fc neonato (FcRn) se describen en los documentos WO 00/42072 (Presta, L.) y US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener sustituciones en una o más de las posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 ó 434 (numeración de residuos EU). La variante de anticuerpo que comprende región Fc con mejor unión de FcRn preferida comprende sustituciones de aminoácidos en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de su región Fc (numeración de residuos EU). En una realización, el anticuerpo tiene 307/434 mutaciones.

Se contemplan además los anticuerpos diseñados con tres o más (preferentemente, cuatro) sitios de unión de antígeno funcionales (Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. US 2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan por medio de una diversidad de métodos conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos naturales), o la preparación mediante la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis de PCR (sigla en inglés de "reacción en cadena de la polimerasa") y mutagénesis de casete de una variante anteriormente preparada o una versión no variante del anticuerpo.

(v) Inmunosconjugados.

La invención además se refiere a inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo que se describe en esta solicitud, conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal o sus fragmentos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descripto con anterioridad. Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que pueden usarse incluyen 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. Pueden obtenerse una diversidad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{186}\text{Re}$ .

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico pueden elaborarse usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), 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 tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina según se describe en la referencia de Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). Un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo es ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14. Ver el documento WO 94/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede ser conjugado con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en la dirección previa al tumor, donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, luego se elimina de la circulación el conjugado no ligado, usando un agente de aclaramiento, y a continuación, se administra un "ligando" (por ejemplo, avidina), que es conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

(vi). Inmunoliposomas.

El anticuerpo revelado en la presente solicitud además puede 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.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77: 4030 (1980); y Patentes 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, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico (tal como doxorrubicina). Ver la referencia de Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81 (19): 1484 (1989).

**VIII. Artículos de fabricación y equipos.**

En otra realización de la invención, se provee un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos con anterioridad. El artículo de fabricación comprende un recipiente, un rótulo y un prospecto. 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. 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 la punción con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un ingrediente activo en la composición es un anticuerpo anti-VEGF. El rótulo sobre el recipiente, o asociado con el recipiente, indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección particular. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un regulador farmacéuticamente aceptable, tal como 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. Además, el

artículo de fabricación puede comprender un prospecto con instrucciones para el uso, que incluye, por ejemplo, una advertencia de que la composición no debe usarse en combinación con otra composición, o instrucciones para el usuario de la composición acerca de la administración a un paciente de la composición de anticuerpo anti-VEGF sola o en combinación con una composición antineoplásica, por ejemplo, leucovorina, 5-FU, oxaliplatino, irinotecano o sus combinaciones. El término "instrucciones para el uso" significa la provisión de instrucciones para la terapia aplicable, la medicación, los regímenes de tratamiento y similares, por cualquier medio, por ejemplo, por escrito, tal como en forma de prospectos u otro material de promoción escrito.

El antagonista específico de VEGF puede envasarse solo o en combinación con otros compuestos terapéuticos antineoplásicos en forma de un equipo. El equipo puede incluir componentes opcionales que ayudan en la administración de la dosis unitaria al paciente, por ejemplo, viales para la reconstitución de las formas de polvo, jeringas para inyección, sistemas de suministro IV adaptados, inhaladores, etc. Además, el equipo de dosis unitarias puede contener instrucciones para la preparación y administración de las composiciones. El equipo puede fabricarse como una dosis unitaria de un solo uso para un paciente, como múltiples usos para un paciente particular (con una dosis constante, o donde la potencia de los compuestos individuales puede variar a media que avanza la terapia); o el equipo puede contener múltiples dosis adecuadas para la administración a múltiples pacientes ("envasado en volumen"). Los componentes del equipo pueden montarse en cartones, envases ampollados, botellas, tubos y similares.

La invención provee un equipo para el tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, por ejemplo, un tumor primario, que comprende un envase, donde el envase comprende una composición de anticuerpo anti-VEGF e instrucciones para el uso de la composición de anticuerpo anti-VEGF en la terapia complementaria, donde las instrucciones establecen que la DFS a 1 año luego del inicio de la terapia complementaria para pacientes que recibieron la terapia complementaria fue de 94,3, con una relación de riesgo de 0,60.

**Depósito de materiales.**

La siguiente estirpe celular de hibridoma ha sido depositada bajo las cláusulas del Tratado de Budapest, en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA:

| <b><u>Designación de anticuerpo</u></b> | <b><u>ATCC Nro.</u></b> | <b><u>Fecha de depósito</u></b> |
|-----------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| A4.6.1                                  | ATCC HB-10709           | 29 de marzo de 1991             |

El siguiente ejemplo solo tiene la intención de ilustrar la práctica de la presente invención, y no se provee a modo de limitación.

**EJEMPLOS****Ejemplo 1. Terapia complementaria de bevacizumab en pacientes con cáncer colorrectal.**

Este ejemplo se refiere al análisis de los resultados obtenidos en sujetos con cáncer colorrectal tratados en el ensayo clínico National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP C-08) (Proyecto Nacional complementario quirúrgico de mama e intestino). El objetivo primario del estudio fue determinar el beneficio clínico de la adición de bevacizumab a la quimioterapia convencional para el tratamiento de cáncer colorrectal, medido por la sobrevida libre de enfermedad (DFS). Una segunda meta fue determinar si había beneficio clínico en la prolongación de la sobrevida general. La quimioterapia convencional utilizada en este ensayo fue una combinación de leucovorina, 5-fluoruracilo y oxaliplatino. Este ensayo evaluó la eficacia de bevacizumab (AVASTIN®) como terapia complementaria para pacientes con carcinoma de colon resecado de etapas II y III.

### Diseño del estudio.

El diseño del estudio NSABP C-08 se representa en las Figuras 1 y 2.

En el ensayo NSABP C-08, se usó el siguiente protocolo de tratamiento:

Grupo A/Grupo 1: FOLFOX6 modificado (mFOLFOX6: oxaliplatino (85 mg/m<sup>2</sup>) con leucovorina concurrente (400 mg/m<sup>2</sup>) y 5-FU (400 mg/m<sup>2</sup>, bolo IV) el Día 1 y 5-FU (2400 mg/m<sup>2</sup>) durante 46 horas el Día 1 y el Día 2), q 14 días durante 12 ciclos (6 meses);

Grupo B/Grupo 2: FOLFOX6 modificado, q 14 días durante 12 ciclos (6 meses) más bevacizumab administrado antes de oxaliplatino el Día 1 de cada ciclo de quimioterapia (5 mg/kg, IV), q 14 días durante 1 año.

Bevacizumab (AVASTIN®) se suministró como un líquido estéril, transparente a levemente opalescente, listo para la administración parenteral en dos tamaños de vial: cada vial de vidrio de 100 mg (25 mg/ml – lleno 4 ml) contenía bevacizumab con fosfato, trehalosa, polisorbato 20 y agua estéril para inyección, USP, y cada vial de vidrio de 400 mg (25 mg/ml – lleno 16 ml) contenía bevacizumab con fosfato, trehalosa, polisorbato 20 y agua estéril para inyección, USP. Se administró AVASTIN® mediante la extracción de la cantidad necesaria para una dosis de 5 mg/kg y la dilución en un volumen total de 100 ml de cloruro sódico para inyección al 0,9%, USP, antes de la administración intravenosa.

A fin de calificar estos ensayos, se solicitó a los pacientes que tuvieran adenocarcinoma del colon histológicamente confirmado que cumpliera una de las siguientes etapas:

(1) Carcinoma de etapa II (T<sub>3</sub> o 4, N<sub>0</sub>, M<sub>0</sub>) (el tumor ha invadido a través de la capa muscular (*muscularis propria*), en la subserosa o en tejidos perirrectales o pericólicos no peritonealizados (T<sub>3</sub>); o ha invadido directamente otros órganos u otras estructuras, y/o perfora el peritoneo visceral (T<sub>4</sub>)); o

(2) Carcinoma de etapa III (cualquier T, N<sub>1</sub> o 2, M<sub>0</sub>) (el tumor ha invadido hasta cualquier profundidad, con compromiso de nodos linfáticos regionales).

Los pacientes con tumores T4 que tenían compromiso de una estructura adyacente (por ejemplo, vejiga, intestino delgado, ovario, etc.) por extensión directa desde el tumor primario eran idóneos si se cumplían la totalidad de la siguientes condiciones:

- (1) la totalidad o una porción de la estructura adyacente fue removida *en bloc* con el tumor primario;
- (2) en la opinión del cirujano, todo el tumor groseramente visible fue extirpado por completo (“resección curativa”);

(3) la evaluación histológica del patólogo confirmó que los márgenes de la muestra extirpada no están comprometidos por las células malignas; y

(4) no se utilizaría la terapia de radiación local.

Los pacientes con más de un tumor de colon primario sincrónico fueron idóneos, donde la clasificación de etapa se basó en el tumor primario más avanzado.

Los pacientes deben haber tenido una resección grosera completa *en bloc* de tumor (resección curativa) por medio de la laparotomía abierta o colectomía asistida con laparoscopia. Los pacientes que tuvieron un procedimiento quirúrgico de dos etapas, a fin de primero proporcionar una colostomía descompresiva y luego, en un procedimiento posterior, tener la resección quirúrgica definitiva, fueron idóneos. El alcance distal del tumor debe ser superior o igual a 12 cm desde el margen externo del ano en la endoscopia. Si el paciente no era candidato para la endoscopia, entonces el alcance distal del tumor debe ser superior o igual a 12 cm desde el margen externo del ano según lo determinado por la examinación quirúrgica.

Los pacientes tenían 18 años de edad o más, tuvieron un grado de actividad ECOG de 0 ó 1, y en la opinión del investigador, debían haber tenido una expectativa de vida de por lo menos 5 años, excluyendo su diagnóstico de cáncer.

En el momento de la aleatorización, los pacientes debían haber tenido un recuento de granulocitos absolutos posoperatorio (AGC según su sigla en inglés) superior o igual a  $1500 \text{ mm}^3$  (o inferior a  $1500/\text{mm}^3$  si, en la opinión del investigador, este representaba una variación étnica o racial de lo normal) y un recuento de plaquetas posoperatorio superior o igual a  $100.000/\text{mm}^3$ . Los pacientes además tenían función hepática y renal normales.

Los pacientes con enfermedades malignas previas, que incluyeron cáncer colorrectal, fueron idóneos si habían estado libres de enfermedad durante por lo menos 5 años, y según lo considerado por el médico de atención, tenían bajo riesgo de recurrencia. Los pacientes con carcinoma de célula basal o escamosa de piel, melanoma *in situ*, carcinoma *in situ* del cuello uterino, carcinoma *in situ* del colon o recto que habían sido tratados eficazmente, aun si estas afecciones fueron diagnosticadas dentro de los 5 años previos a la aleatorización, también fueron idóneos.

Los pacientes no fueron idóneos si tuvieron alguna de las siguientes afecciones: cáncer de colon diferente de adenocarcinoma, tumores rectales, metástasis aisladas distantes o no contiguas intraabdominales (aun si fueron

extirpadas), terapia sistémica o de radiación iniciada para la enfermedad maligna, hemorragia significativa no relacionada con el tumor de colon primario dentro de los 6 meses antes del ingreso al estudio, herida grave o que no cura, úlceras de piel o fractura ósea, úlcera gastroduodenal activa determinada por endoscopia, procedimiento quirúrgico mayor, biopsia abierta o lesión traumática significativa dentro de los 28 días antes de la aleatorización, anticipación de la necesidad de procedimiento quirúrgico mayor durante el curso del ensayo, biopsia central u otro procedimiento menor, excluyendo la colocación de un dispositivo de acceso vascular, dentro de los 7 días previos a la aleatorización, tensión arterial descontrolada (superior a 150/90 mmHg), antecedentes de isquemia cerebrovascular del SNC, antecedentes de isquemia arterial periférica dentro de los 6 meses, antecedentes de isquemia arterial visceral dentro de los 6 meses, agentes antivirales halogenados concomitantes, neuropatía periférica clínicamente significativa en el momento de la aleatorización (toxicidad neuromotora o neurosensorial de grado 2 o superior usando el NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 3.0 (criterios comunes de terminología para eventos adversos)), enfermedad sistémica no maligna que hubiera prohibido el uso de cualquiera de los fármacos del estudio utilizados en el ensayo, embarazo o lactancia en el momento de la aleatorización, trastornos psiquiátricos o adictivos u otras afecciones que, en la opinión del investigador, hubieran evitado que el paciente cumpliera con los requisitos de ensayo del estudio, PT (INR) (siglas en inglés de "tiempo de protrombina luego de la remoción de heparina") > 1,5 a menos que el paciente estuviera tomando antocoagulantes de dosis completa, y el sujeto tuviera un INR en rango con una dosis estable de warfarina o una dosis estable de heparina de bajo peso molecular, y el sujeto no hubiera tenido hemorragia activa o una afección patológica asociada con un alto riesgo de hemorragia.

El criterio de valoración primario de este ensayo fue la duración de la sobrevida libre de enfermedad (DFS). Los eventos para la DFS incluyeron la primera evidencia documentada de recurrencia de cáncer de colon, segundo cáncer primario o muerte por cualquier causa. Los criterios de valoración secundarios fueron la duración de la sobrevida general (OS) y la toxicidad relacionada con la terapia del estudio. Los eventos para la sobrevida general incluyeron la muerte por cualquier causa.

El diagnóstico de la recurrencia del cáncer de colon se efectuó usando los siguientes criterios.

Para sitios abdominales o pélvicos: citología positiva, o biopsia, si es anastomótico.

Ganglios abdominales, pélvicos y retroperitoneales: (1) biopsia o citología positiva, (2) ganglios progresivamente crecientes, según lo evidenciado por dos imágenes TAC (tomografía axial computarizada) o IRM (imagen de resonancia magnética) separadas por un intervalo de al menos 4 semanas, (3) obstrucción ureteral en presencia de una masa según lo documentado en la imagen de TAC o IRM, o (4) una sola imagen de TAC o IRM que muestra una masa definida maligna según lo confirmado por una imagen PET (sigla en inglés de "tomografía por emisión de positrones") positiva en dicho sitio.

Peritoneo (que incluye peritoneo visceral y peritoneo parietal o epiplón): (1) biopsia o citología positiva; o (2) masa sólida intraperitoneal progresivamente creciente según lo evidenciado por dos imágenes de TAC o IRM separadas por un intervalo de al menos 4 semanas, o una sola imagen maligna según lo confirmado por una imagen PET positiva en dicho sitio.

Ascitis: citología positiva.

Hígado: (1) biopsia o citología positiva; o (2) tres de los siguientes eventos que no se asocian con enfermedad benigna: (i) hepatomegalia reciente o progresiva, contorno hepático anormal; (ii) ecografía o imagen hepática de redionucleótido positiva; (iii) imagen de PET positiva que confirma la imagen anormal de TAC o IRM y que se asocia con un CEA (sigla en inglés de "antígeno carcinoembrionario") creciente; (iv) estudios anormales de la función hepática; o (v) CEA elevado, es decir, una elevación persistente en la valoración de CEA de 10 veces más que el valor normal superior, confirmado en dos determinaciones separadas por un intervalo de 4 semanas, en pacientes que tuvieron un valor normal de CEA posoperatorio (la determinación debe ser efectuada por el mismo laboratorio, usando el mismo método).

Masa pélvica no especificada de otro modo (NOS, según su sigla en inglés): (1) biopsia o citología positiva; o (2) masa sólida intrapélvica progresivamente creciente, según lo evidenciado por dos imágenes TAC o IRM separadas por un intervalo de al menos 4 semanas, o (3) una masa sólida en una sola imagen TAC confirmada por una imagen PET positiva en dicho sitio.

Pared abdominal, periné y cicatriz: biopsia o citología positiva.

Sitios no abdominales y no pélvicos:

Esquelético: para toda recurrencia solo ósea, se requiere una biopsia.

Pulmón: (1) biopsia, aspiración o citología positiva, o (2) evidencia radiológica de múltiples nódulos pulmonares consecuentes con metástasis pulmonares.

Médula ósea: imagen de IRM, biopsia, aspiración o citología positiva.

Sistema nervioso central: (1) imagen positiva de TAC o IRM, habitualmente, en un paciente con síntomas neurológicos; o (2) biopsia o citología (para un diagnóstico de compromiso meníngeo).

El diagnóstico de un segundo cáncer primario fue confirmado histológicamente cuando fue posible.

### **Resultados.**

Los resultados de este ensayo indican que la adición de AVASTIN® a la quimioterapia aumentó de manera significativa la DFS en comparación con la quimioterapia sola, durante el primer año, que corresponde a la fase de tratamiento activo. La información muestra que este beneficio significativo no se asoció con ninguna toxicidad mayor o ningún efecto adverso.

Se reclutaron 2710 pacientes para el estudio (1356 para el grupo de control, y 1354, para el grupo experimental). No se evaluaron 18 pacientes en el grupo de control y 20 pacientes en el grupo experimental en términos de eficacia, debido a que no hubo seguimiento, o debido a márgenes quirúrgicos positivos. Además, se halló que 22 pacientes del grupo de control y 15 pacientes del grupo experimental no fueron idóneos por otras razones, si bien se incluyeron en el análisis. Por lo tanto, se incluyeron en estos análisis 1338 y 1334 pacientes en el grupo de control y en el grupo experimental, respectivamente. La mediana de seguimiento fue de 35,6 meses. Las características de los pacientes fueron equilibradas por el grupo de tratamiento. Poco más de la mitad de los pacientes tenían menos de 60 años de edad, aproximadamente el 15% tenían más de 70 años, y la distribución de géneros fue igualitaria. Los pacientes de la etapa II constituyeron aproximadamente el 25%.

El tiempo hasta un evento se midió a partir de la aleatorización. Todos los valores p, diferentes del criterio de valoración primario, se evaluaron como significativos en el nivel de 0,05 bilateral. Todos los intervalos de confianza fueron del 95%. Las relaciones de riesgo (HR) se calcularon a partir de modelos Cox, y los valores p desde el tiempo hasta el evento fueron del ensayo de rango log. Los valores de HR y valores p se estratificaron por la cantidad de ganglios positivos, cuando fue posible. Se compararon las proporciones por el método exacto de

Fischer. El análisis primario se basó en la intención de tratamiento principal, excluyendo solamente pacientes sin seguimiento y pacientes que no tenían riesgo para el criterio de valoración primario en el momento de la aleatorización (que se sabía tenían metástasis o márgenes quirúrgicos positivos). Se calcularon estimaciones llanas de las funciones de riesgo subyacente por el método de Muller y Wang (*Biometrics*, 1994 50: 61–76). Las estimaciones llanas de la relación de los riesgos subyacentes se calcularon por el método de Gilbert *et al.* (*Biometrics*, 2002, 58: 773–80).

Los resultados fueron los siguientes:

|                           | Nro. de<br>pacientes | Nro. de<br>eventos | 3 años DFS<br>(%) | valor p |
|---------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|---------|
| mFOLFOX6                  | 1338                 | 312                | 75,5              |         |
| mFOLFOX6 +<br>bevacizumab | 1334                 | 291                | 77,4              | 0,15    |

Para los pacientes con enfermedad en etapa II, las DFS de 3 años fueron 87,4% y 84,7% (HR = 0,82 IC 0,54–1,25; p = 0,35), y para los de la etapa III, 74,2% y 72,4% (HR = 0,90 IC 0,76–1,07; p = 0,23), para los grupos experimental y de control, respectivamente.

La relación de riesgo (HR) final fue 0,888, con un valor p de 0,146. La relación de riesgo (HR) y los valores p evaluados en función del tiempo fueron los siguientes:

| Año(s)<br>luego del<br>inicio del<br>tratamiento | 1      | 1,25    | 1,5   | 2    | 2,5  | 3    |
|--------------------------------------------------|--------|---------|-------|------|------|------|
| HR                                               | 0,6    | 0,61    | 0,74  | 0,81 | 0,85 | 0,87 |
| valor p                                          | 0,0004 | <0,0001 | 0,004 | 0,02 | 0,05 | 0,08 |

La DFS a 1 año luego del inicio del tratamiento fue de 94,3, para los pacientes tratados con mFOLFOX6 + bevacizumab, y de 90,7, para los pacientes tratados con mFOLFOX6 solo (la HR fue de 0,60, con un valor p de 0,0004). Bevacizumab tuvo un fuerte efecto durante los primeros 1,25 años (HR = 0,61 95% IC, 0,48–0,78, p < 0,0001). Esta información indica que la adición de bevacizumab a la quimioterapia confirió un beneficio clínicamente significativo durante la fase de tratamiento activo (primeros 12 meses luego del inicio del tratamiento) en la cual se administró bevacizumab al paciente, y poco después.

Estos resultados además muestran, por primera vez, que la administración de bevacizumab durante más de 1 año es beneficiosa para el paciente.

A partir de la descripción precedente, será evidente que pueden efectuarse variaciones y modificaciones a la invención descrita en esta solicitud, a fin de adaptarla a diversos usos y afecciones. Dichas realizaciones también se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC., et al.

<120> TERAPIA COMPLEMENTARIA CONTRA EL CÁNCER

<130> P4196R1 WO

<141> 20-04-2010

<150> US 61/171.008

<151> 20-04-2009

<150> US 61/171.318

<151> 21-04-2009

<150> US 61/181.195

<151> 26-05-2009

<160> 2

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia es sintetizada

<400> 1

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 Tyr Thr Phe Thr  
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr  
50 55 60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser  
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser  
95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
110 115 120

Val Ser Ser

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia es sintetizada

<400> 2

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

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

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

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

### **REIVINDICACIONES**

1. Un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente con cáncer, luego de la cirugía definitiva, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, de manera de extender la sobrevida libre de enfermedad (DFS) o la sobrevida general (OS) en el paciente, donde el antagonista específico de VEGF se administra durante más de un año.

2. El método de la reivindicación 1, donde se evalúa la DFS o la OS alrededor de 2 a alrededor de 5 años luego del inicio del tratamiento con el antagonista específico de VEGF.

3. El método de la reivindicación 1, donde la extensión de la DFS o la OS comprende la prevención o demora de la recurrencia del cáncer, o la prevención o demora de la aparición de un segundo cáncer primario.

4. Un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente con cáncer, luego de la cirugía definitiva, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora el avance del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año.

5. El método de la reivindicación 4, donde el avance del cáncer se previene o demora durante alrededor de 6 meses después de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF.

6. Un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente con cáncer, luego de la cirugía definitiva, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o

demora la recurrencia del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año.

7. El método de la reivindicación 6, donde la recurrencia del cáncer se previene o demora durante alrededor de 6 meses después de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF.

8. Un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF de manera de extender la DFS o la OS en el paciente, donde el antagonista específico de VEGF se administra durante más de un año.

9. El método de la reivindicación 8, donde la DFS o la OS se evalúa alrededor de 2 a alrededor de 5 años luego del inicio del tratamiento con el antagonista específico de VEGF.

10. El método de la reivindicación 8, donde la extensión de la DFS o la OS comprende la prevención o demora de la recurrencia del cáncer, o la prevención o demora de la aparición de un segundo cáncer primario.

11. Un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora el avance del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año.

12. El método de la reivindicación 11, donde el avance del cáncer se previene o demora durante alrededor de 6 meses después de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF.

13. Un método de terapia complementaria, que comprende la administración a un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora la recurrencia del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año.

14. El método de la reivindicación 13, donde la recurrencia del cáncer se previene o demora durante alrededor de 6 meses después de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF.

15. Un método de tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, que comprende la administración al paciente, de terapia complementaria que comprende una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF de manera de extender la DFS o la OS en el paciente, donde el antagonista específico de VEGF se administra durante más de un año.

16. El método de la reivindicación 15, donde la DFS o la OS se evalúa alrededor de 2 a alrededor de 5 años luego del inicio del tratamiento con el antagonista específico de VEGF.

17. El método de la reivindicación 15, donde la extensión de la DFS o de la OS comprende la prevención o demora de la recurrencia del cáncer, o la prevención o demora de la aparición de un segundo cáncer primario.

18. Un método de tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, que comprende la administración al paciente, de terapia complementaria que comprende una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora el avance del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año.

19. El método de la reivindicación 18, donde el avance del cáncer se previene o demora durante alrededor de 6 meses luego de que ha cesado el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF.

20. Un método de tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, que comprende la administración al paciente, de terapia complementaria que comprende una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF, donde se previene o demora la recurrencia del cáncer durante el tratamiento activo con el antagonista específico de VEGF, y donde el tratamiento activo dura más de un año.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1–20, donde dicha administración del antagonista específico de VEGF previene o reduce la probabilidad de aparición o recurrencia de un tumor clínicamente detectable, o su metástasis.

22. Un método de prevención de la recurrencia del cáncer en un paciente, que comprende la administración al paciente, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF durante más de un año, donde dicha administración del antagonista específico de VEGF previene la recurrencia del cáncer.

23. Un método para disminuir la probabilidad de recurrencia del cáncer en un paciente, que comprende la administración al paciente, de una cantidad eficaz de un antagonista específico de VEGF durante más de un año, donde dicha administración del anticuerpo anti-VEGF disminuye la probabilidad de recurrencia del cáncer.

24. El método de la reivindicación 22 o de la reivindicación 23, donde el paciente se ha sometido a la cirugía definitiva antes de la administración del antagonista específico de VEGF.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1–24, donde se identifica que el paciente tiene riesgo de recurrencia del cáncer, o baja probabilidad de sobrevida, luego de la cirugía definitiva.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1–24, donde el método además comprende la administración de un agente quimioterapéutico al paciente.

27. El método de la reivindicación 26, donde el tratamiento con el antagonista específico de VEGF es concurrente con el tratamiento con el agente quimioterapéutico.

28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1–24, donde el antagonista específico de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

29. El método de la reivindicación 28, donde el anticuerpo anti-VEGF se administra al paciente por lo menos 28 días después de la cirugía definitiva.

30. El método de la reivindicación 28, donde el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

31. El método de la reivindicación 30, donde el anticuerpo anti-VEGF se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709.

32. El método de la reivindicación 30, donde el anticuerpo anti-VEGF tiene una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGG      LVQPGGSLRL      SCAASGYTFT      NYGMNWVRQA  
PGKGLEWVGWINTYTGEPTY    AADFKRRFTF    SLDTSKSTAY    LQMNSLRAED  
TAVYYCAKYPHYYGSSHWYF DVWGQGTLVT VSS (SEC. ID. NRO.: 1)

y una región variable de cadena liviana que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIFY  
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ  
GTKVEIKR (SEC. ID. NRO.: 2).

33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1–32, donde el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer de ovario o glioblastoma.

34. Un equipo para el tratamiento de un paciente que se ha sometido a la cirugía definitiva del cáncer, que comprende un envase, donde el envase comprende una composición de anticuerpo anti-VEGF e instrucciones para el uso de la composición de anticuerpo anti-VEGF en la terapia complementaria, donde las instrucciones establecen que la DFS a 1 año luego del inicio de la terapia complementaria para pacientes que recibieron la terapia complementaria fue de 94,3, con una relación de riesgo de 0,60.

**RESUMEN**

En la presente solicitud, se revelan métodos y composiciones que comprenden anticuerpos anti-VEGF para el uso en la terapia complementaria del cáncer.

FIGURA 1

Grupo A

5

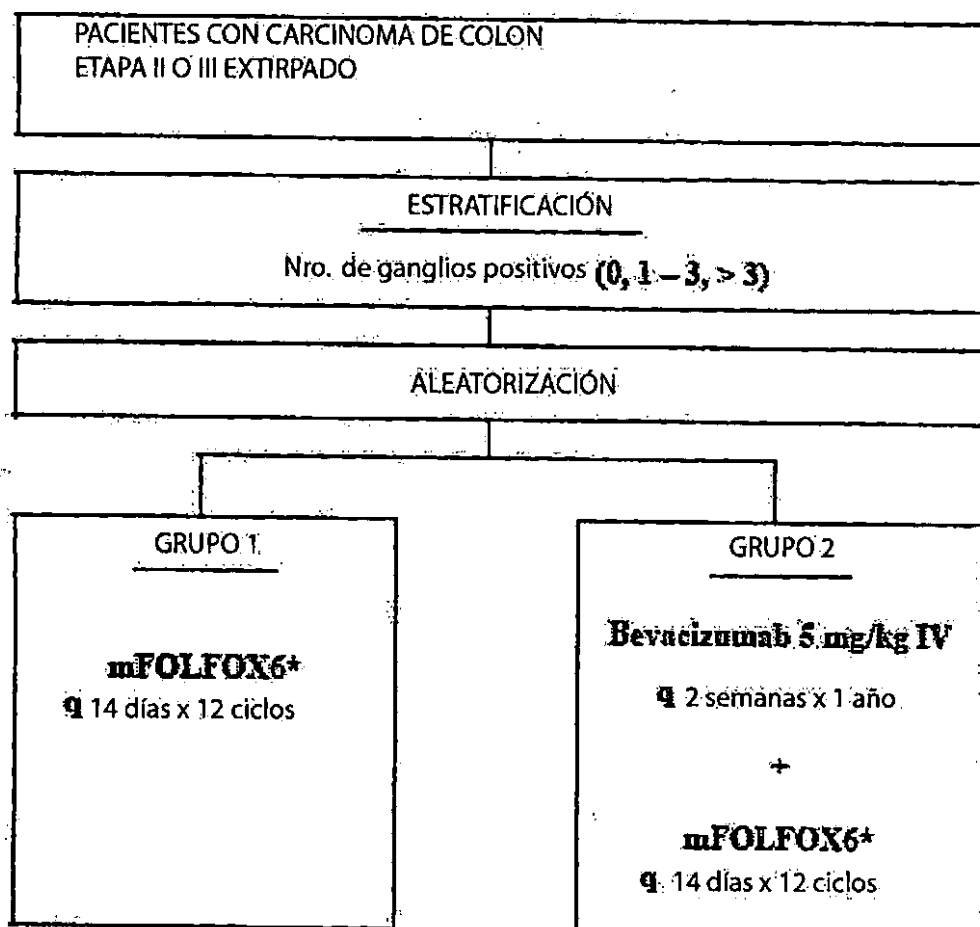
| Fármaco      | Dosis                                      | Administración                                                                                                                                            | Intervalo de dosificación | Duración planeada |
|--------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------|
| Oxaliplatino | 85 mg/m <sup>2</sup>                       | Administrado IV en forma concurrente con bolsas de infusión separadas de 250 ml de D5W y líneas separadas conectadas por entubado línea Y durante 2 horas | Día 1<br>q 14 días        | 12 Ciclos         |
| Leucovorina  | 400 mg/m <sup>2</sup>                      |                                                                                                                                                           |                           |                   |
| 5-FU         | 400 mg/m <sup>2</sup>                      |                                                                                                                                                           |                           |                   |
| 5-FU         | 2400 mg/m <sup>2</sup><br>durante 46 horas | Infusión continua IV durante 46 horas                                                                                                                     | Días 1 y 2 q 14 días      |                   |
|              |                                            |                                                                                                                                                           |                           |                   |

Grupo B

| Fármaco      | Dosis                                      | Administración                                                                                                                                                                                           | Intervalo de dosificac. | Duración planeada      |
|--------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Bevacizumab  | 5 mg/kg                                    | IV diluido en 100 ml de solución de NaCl al 0,9% suministrado durante un período de:<br>90 min – 1ra. dosis<br>60 min – 2da. dosis<br>30 min – todas las dosis posteriores<br>Línea infusión instantánea | Día 1<br>q 14 días      | 12 meses               |
| Oxaliplatino | 85 mg/kg                                   | IV suministrado en forma concurrente con bolsas de infusión separadas de 250 ml de D5W y líneas separadas conectadas por entubado línea Y durante 2 horas                                                | Día 1<br>q 14 días      | 12 ciclos<br>(6 meses) |
| Leucovorina  | 400 mg/kg                                  |                                                                                                                                                                                                          |                         |                        |
| 5-FU         | 400 mg/kg                                  |                                                                                                                                                                                                          |                         |                        |
| 5-FU         | 2400 mg/m <sup>2</sup><br>durante 46 horas | Infusión continua IV durante 46 horas                                                                                                                                                                    | Días 1 y 2 q 14 días    |                        |
|              |                                            |                                                                                                                                                                                                          |                         |                        |

FIGURA 2

## ESQUEMA C-08

\* régimen **FOLFOX6** modificadoOxaliplatino **85 mg/m<sup>2</sup> IV** Día 1Leucovorina **400 mg/m<sup>2</sup> IV** Día 15-FU **400 mg/m<sup>2</sup>** bolo IV Día 15-FU **2400 mg/m<sup>2</sup>** por infusión IV continua durante 46 horas (Día 1 y Día 2)

# Brigard & Castro

BOGOTÁ - COLOMBIA

## PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Número(s) 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.

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

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 18-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 2005

Firma

Nombre  
Cargo

## POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in

South San Francisco, California 94080-4990  
USA

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

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

This power includes the faculty to ratify or confirm, desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 18-56, Piso 9; my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

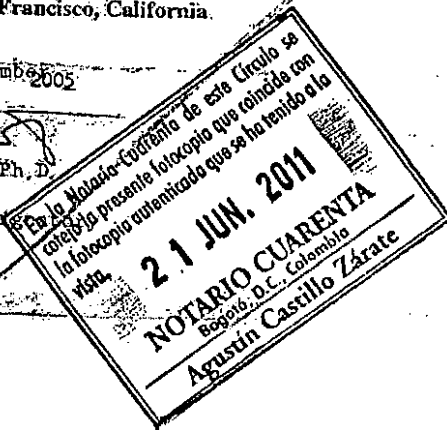
South San Francisco, California  
USA

Granted and signed in

on 6th day of December 2005

Signature:

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



AUTHORIZATION

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

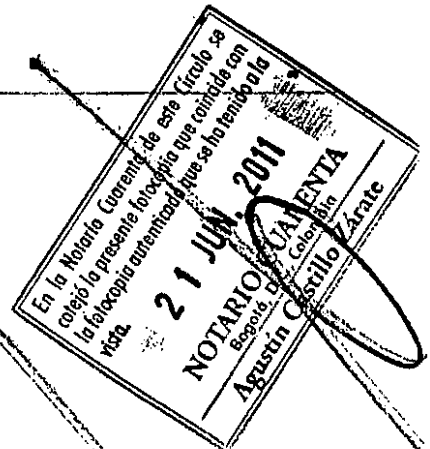
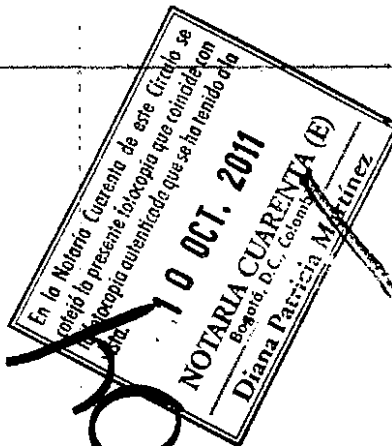
August 27, 2002

Dated

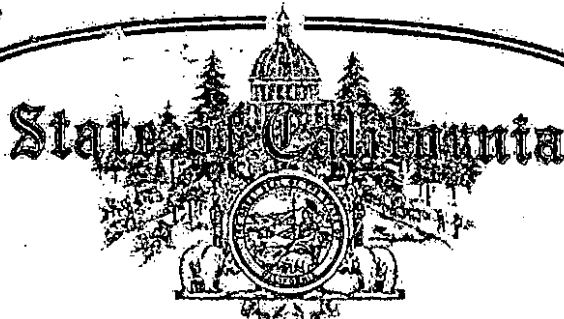
Sean Johnston

Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property  
Genentech, Inc.



P. 77448



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

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

10. Signature.



*Patricia Martinez*  
Secretary of State

NP-21-A (REV. 4-05)

69P-05-00712

En la Notaría Cuarenta de este Circolo se  
cotejó la presente fotocopia que coincide con  
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la  
vista.  
**10 OCT. 2011**  
**NOTARIA CUARENTA (E)**  
Bogotá, D.C., Colombia  
Diana Patricia Martinez

En la Notaría Cuarenta de este Circolo 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 Micala Guzman

personally appeared

Timothy R. Schwartz

Name and Title of Officer (e.g., "John Doe, 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 Micala 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: \_\_\_\_\_

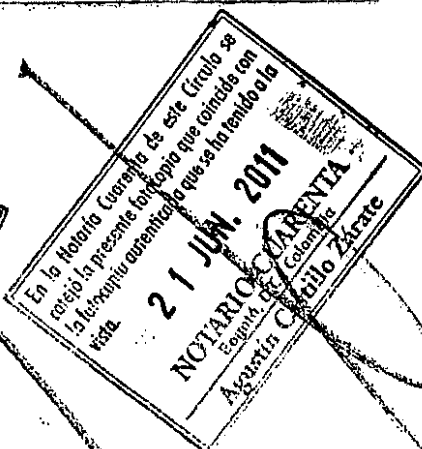
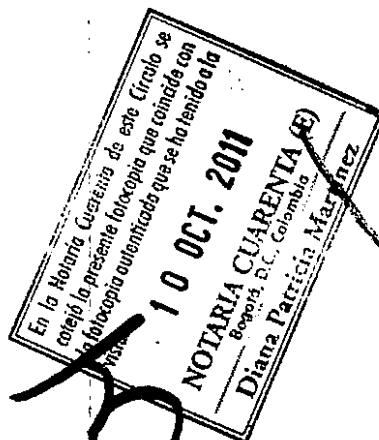
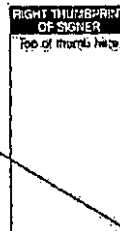
Signer(s) Other Than Named Above: \_\_\_\_\_

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

ESTADO DE CALIFORNIA  
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América  
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.

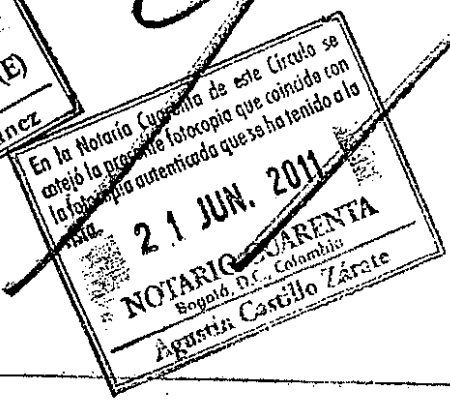
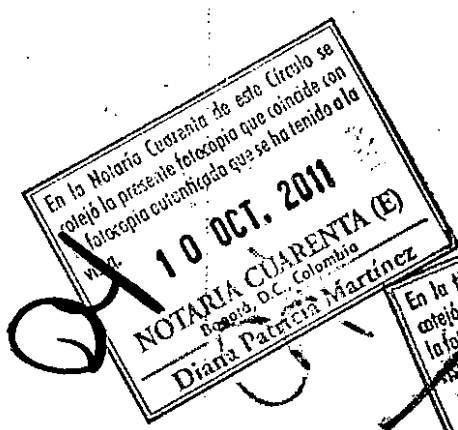
CERTIFICADO

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  
Timothy R. Schwartz

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

☐ 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.

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

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

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: \_\_\_\_\_

Fecha del Documento: \_\_\_\_\_ Número de páginas: \_\_\_\_\_

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

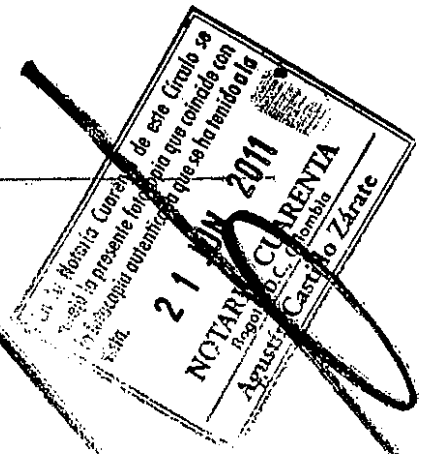
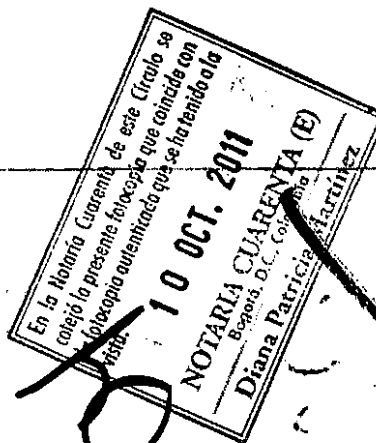
Capacidad(es) Relvindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: \_\_\_\_\_

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

El firmante representa: \_\_\_\_\_

|                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|
| Huella Indica<br>derecho del firmante:<br>Parte alta del dedo aquí |
|--------------------------------------------------------------------|



**AUTORIZACION**

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

27 de Agosto de 2002

Fecha

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual

Genentech, Inc.

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se  
cotejó la presente fotocopia que coincide con  
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la  
vista.

10 OCT. 2011

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

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se  
cotejó la presente fotocopia que coincide con  
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la  
vista.

12 JUN. 2011

NOTARIO CUARENTA  
Bogotá, D.C. Colombia  
Agustín Castillo Zárate

# Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

## Certified

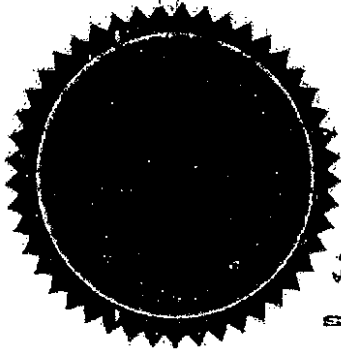
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

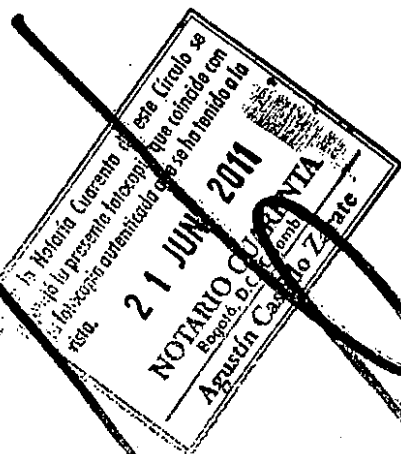
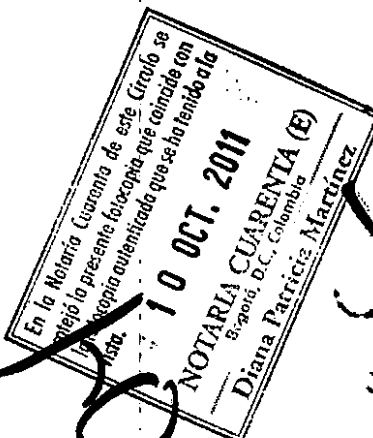
8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

*Harriet Smith Windsor*  
Secretary of State



# Delaware

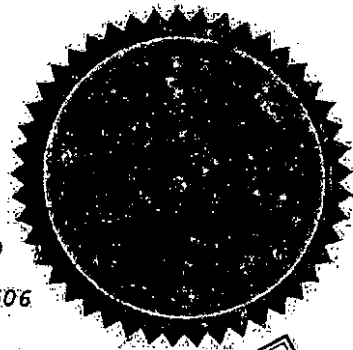
PAGE 1

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 3900884

DATE: 05-24-05

En la Notaria Cuarenta de este Circolo se  
creyó la presente fotocopia que coincide con  
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la  
vista  
10 OCT. 2011  
NOTARIA CUARENTA (E)  
Bogotá, D.C. Colombia  
Diana Patricia Martínez

En la Notaria Cuarenta de este Circolo se  
creyó 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 Zarate

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.

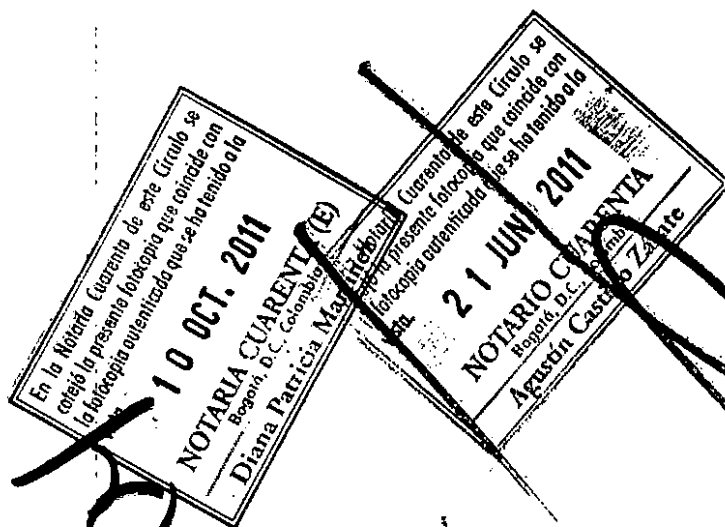
ARTICLE 2

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.

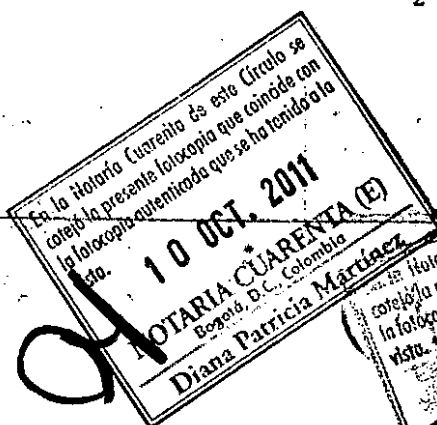
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the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

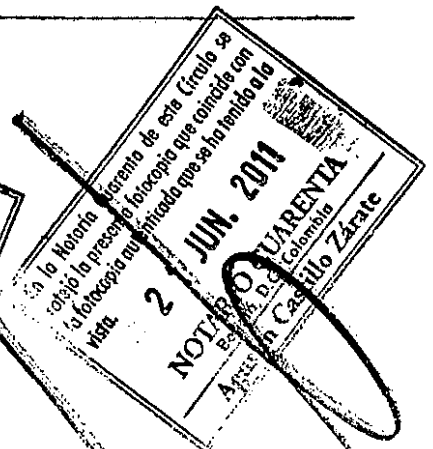
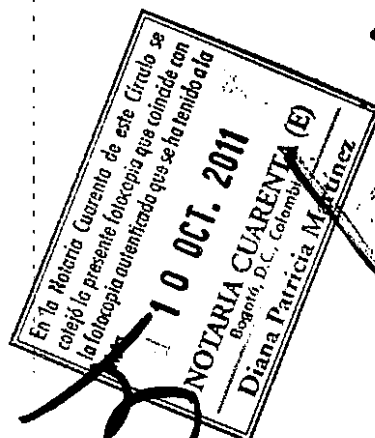
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(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.

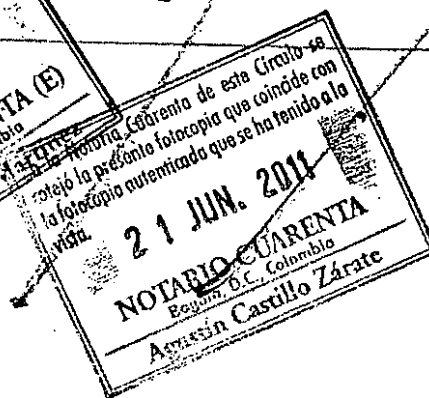
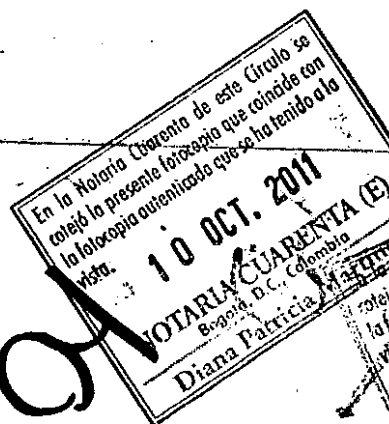
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(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



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.

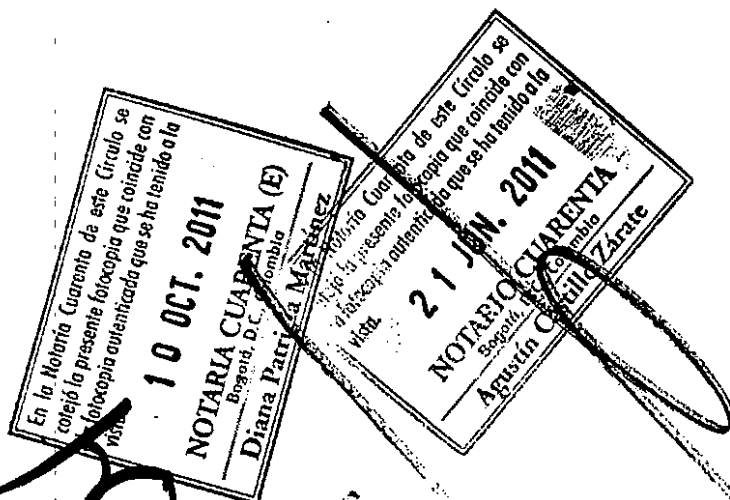
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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.

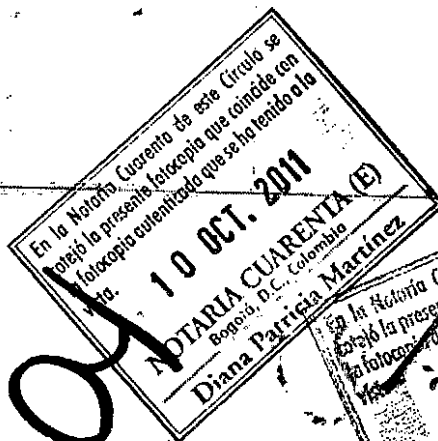
#### ARTICLE 7

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

6.



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

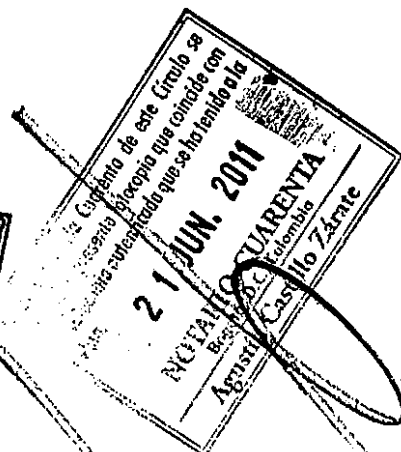
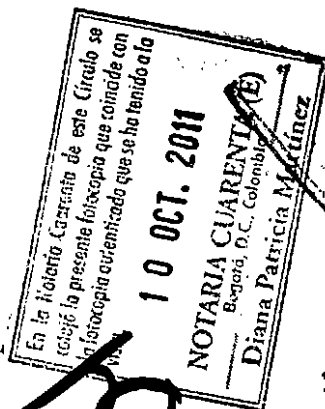
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing:

(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



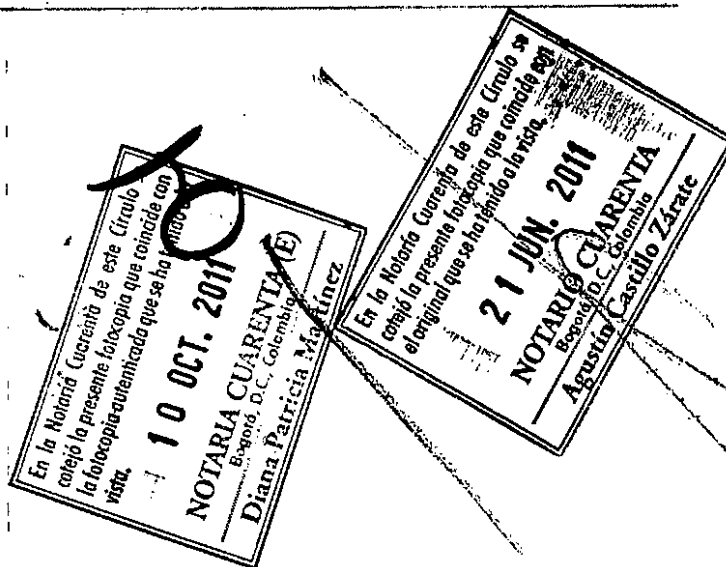
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, 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.

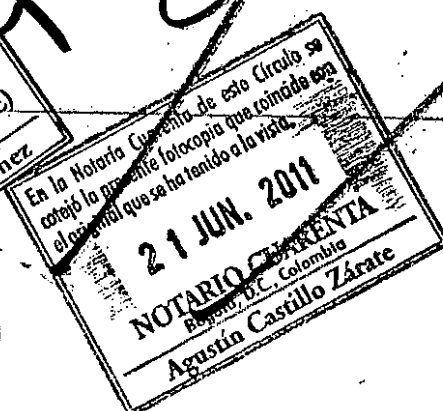
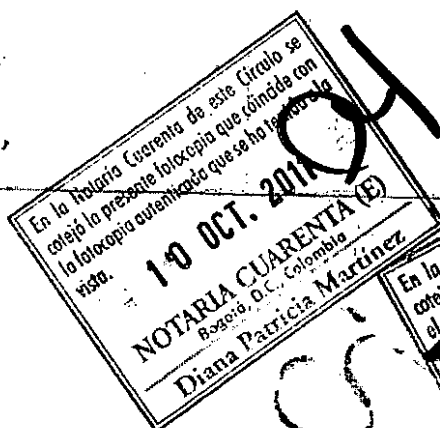
**SECTION 9.04. Deemed Consent by Stockholders.** Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

**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.

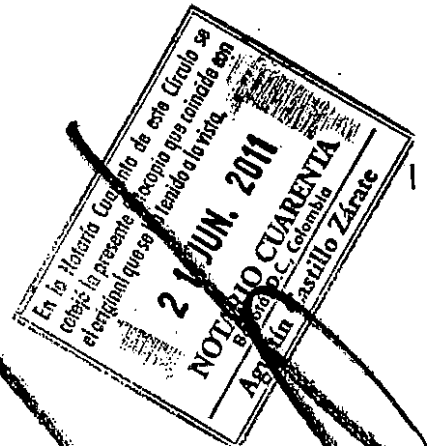
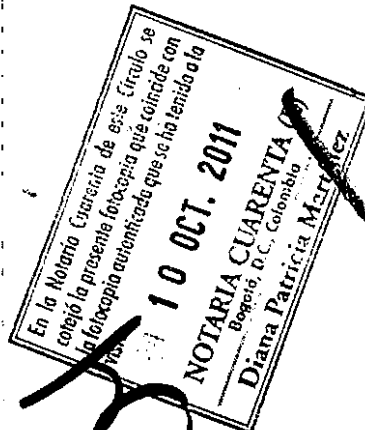
GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President,

General Counsel and Secretary



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

APOSTILLA

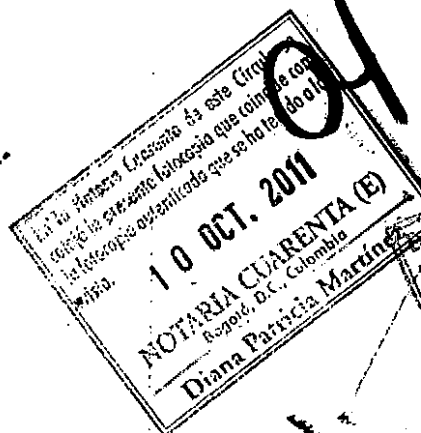
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

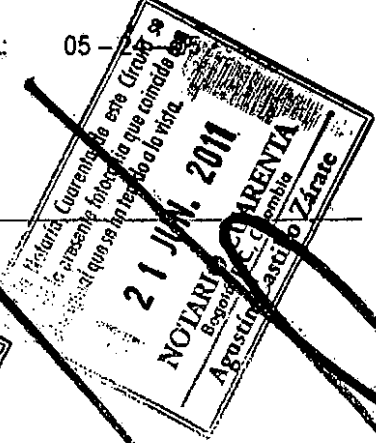
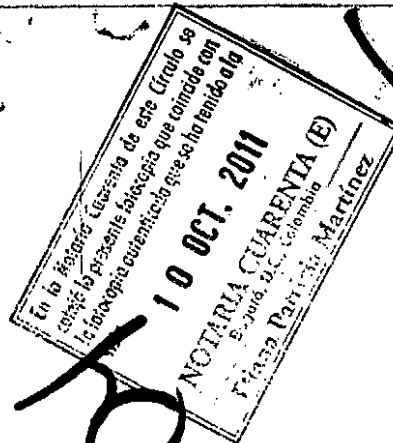


DELAWARE  
EL PRIMER ESTADO

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, Secretaria 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

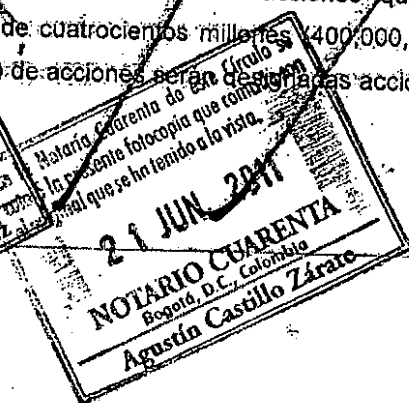
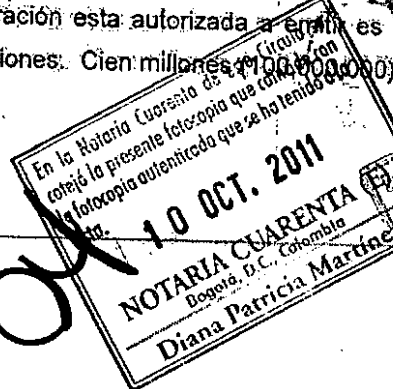
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

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.

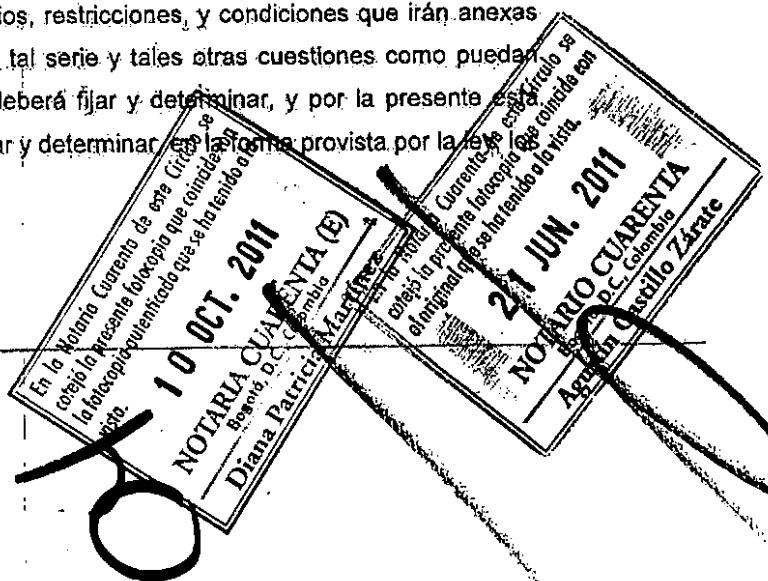
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de 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) *Serie y Limites 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 se expresa autorizada para fijar y determinar en la forma provista por la ley, los



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

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

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

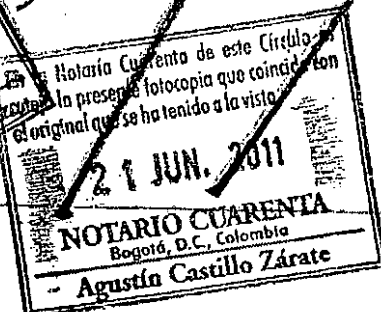
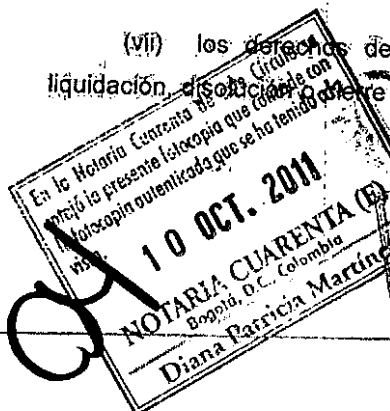
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(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 de una venta 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 está 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.

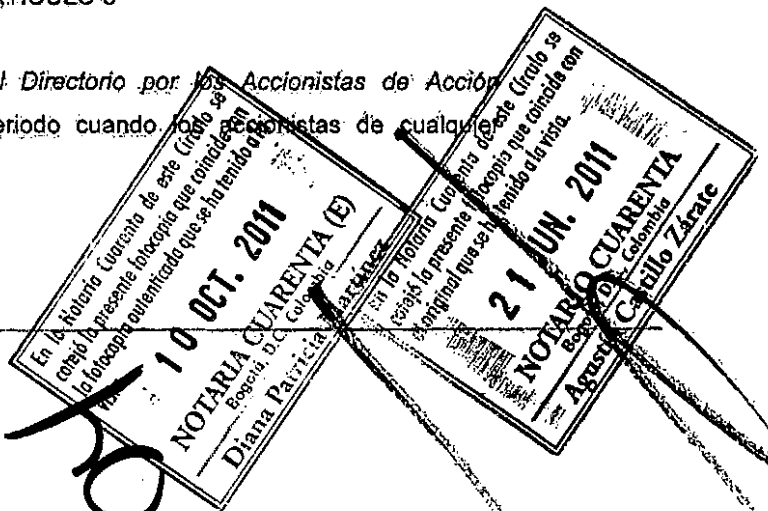
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 6.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(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 den 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 ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

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



permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión 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.

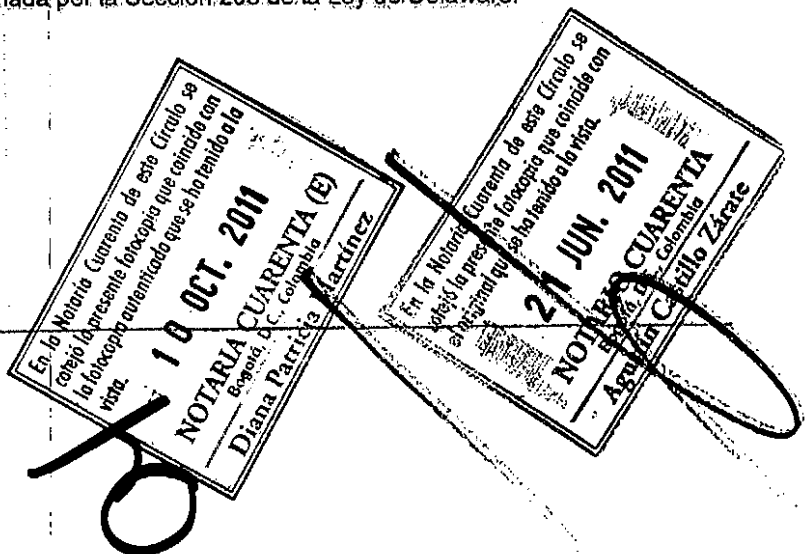
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, 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

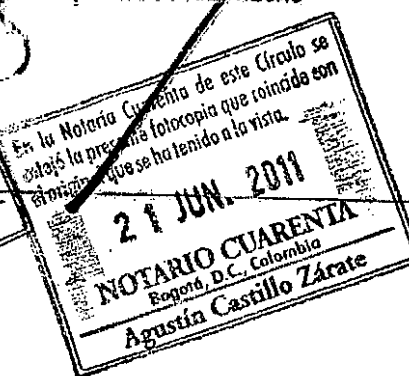
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este 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.

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

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

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

En el evento que Roche adquiriera conocimientos de una transacción 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

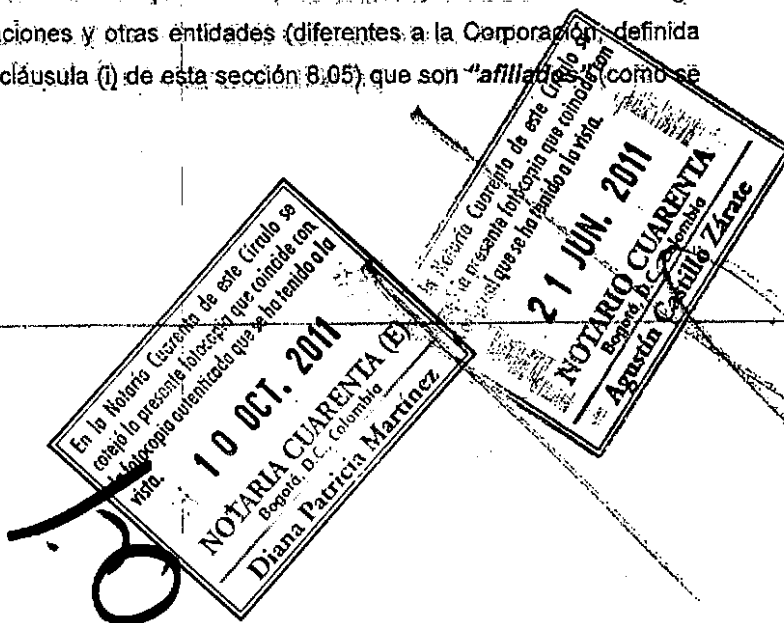


que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

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

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiere algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha 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



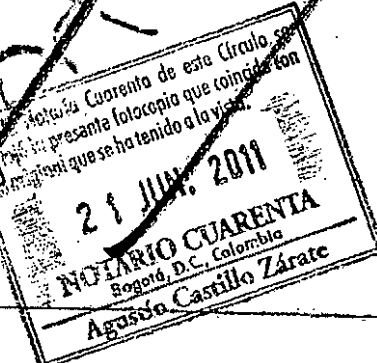
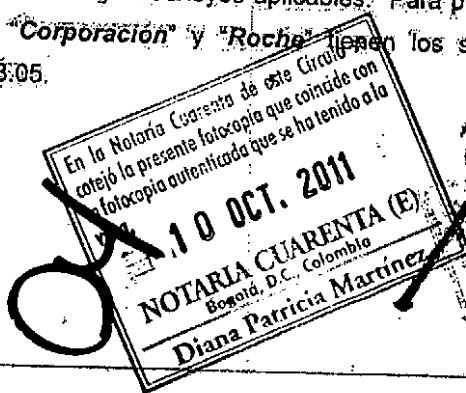
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó de Roche Holdings, Inc.

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 en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque sus o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "Corporación" y "Roche" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

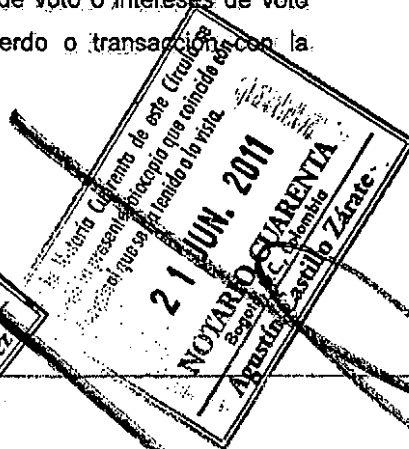
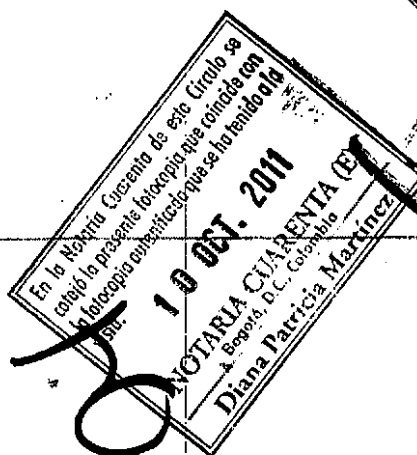


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o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

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

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

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



SECCIÓN 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.

SECCIÓN 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.

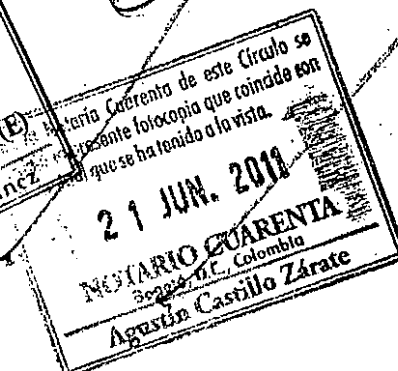
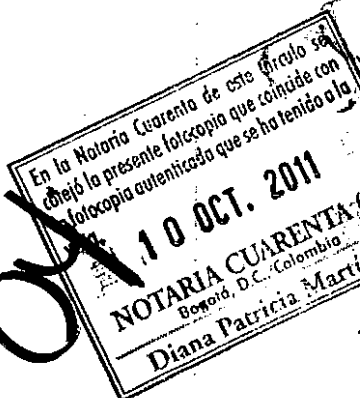
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



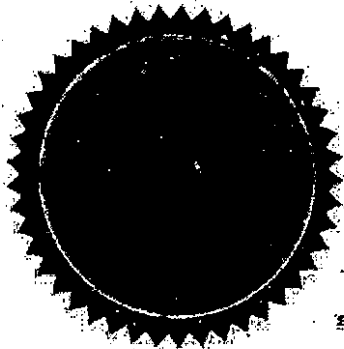
# Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

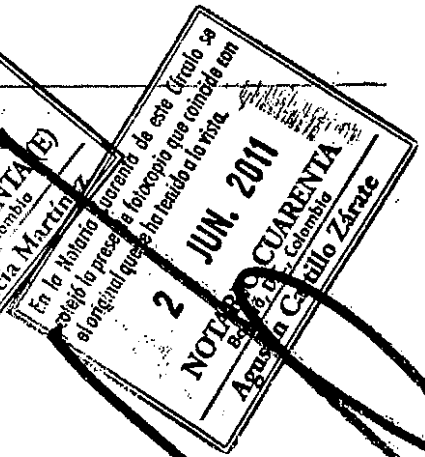
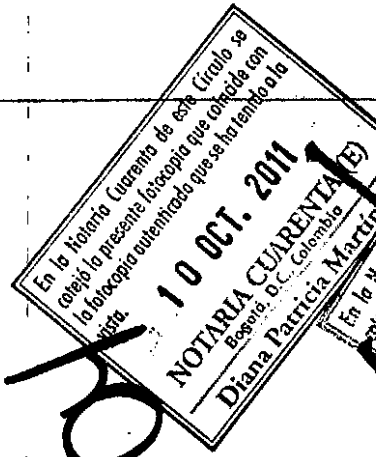
1. Country: United States of America
2. This public document:  
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

## 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. Signature:



*Harriet Smith Windsor*  
Secretary of State



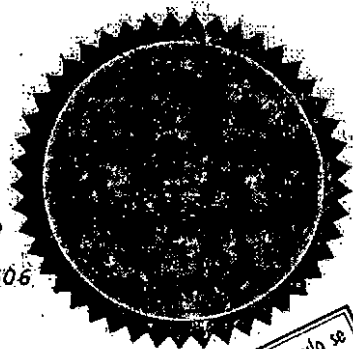
# Delaware

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 FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

2112549  
050426506



*Harriet Smith Windsor*  
Harriet Smith Windsor, Secretary of State  
AUTHENTICATION: 8980385  
DATE: 05-24-05

En la Notaría Cuarenta de este Cirulo se  
cotejó la presente fotocopia que coincide con  
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la  
vista.  
10 OCT. 2011  
NOTARIA CUARENTA (E)  
Bogotá, D.C., Colombia  
Diana Patricia Martínez

En la Notaría Cuarenta de este Cirulo 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

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.

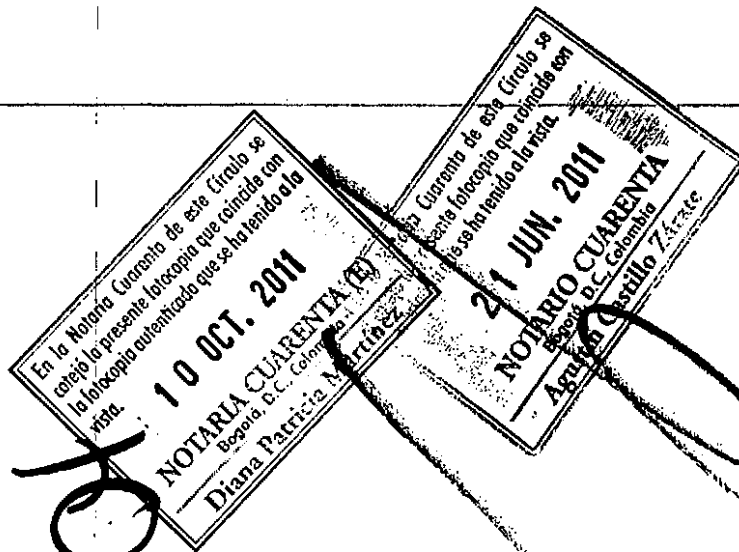
IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By:

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

75841



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

APOSTILLA

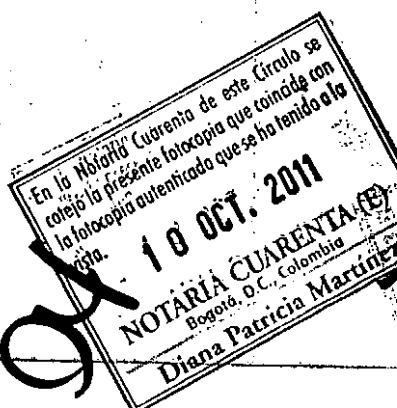
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

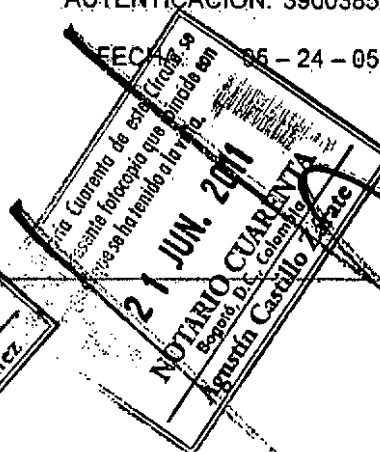
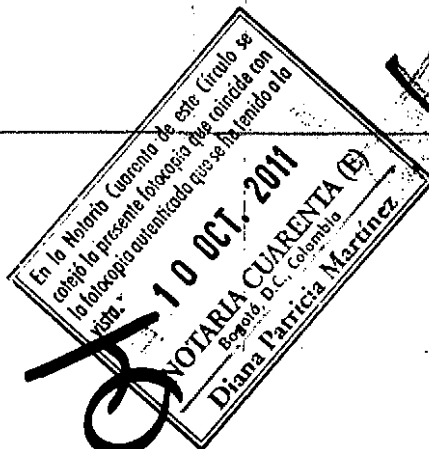


DELAWARE  
EL PRIMER ESTADO

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

REC- 95-24-05



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 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 setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

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

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se  
cotejó la presente fotocopia que coincide con  
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la  
vista.  
10 OCT. 2011  
NOTARIA CUARENTA (E)  
Bogotá, D.C., Colombia  
Diana Patricia Martínez

En la Notaría Cuarenta de este Circuito 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

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.

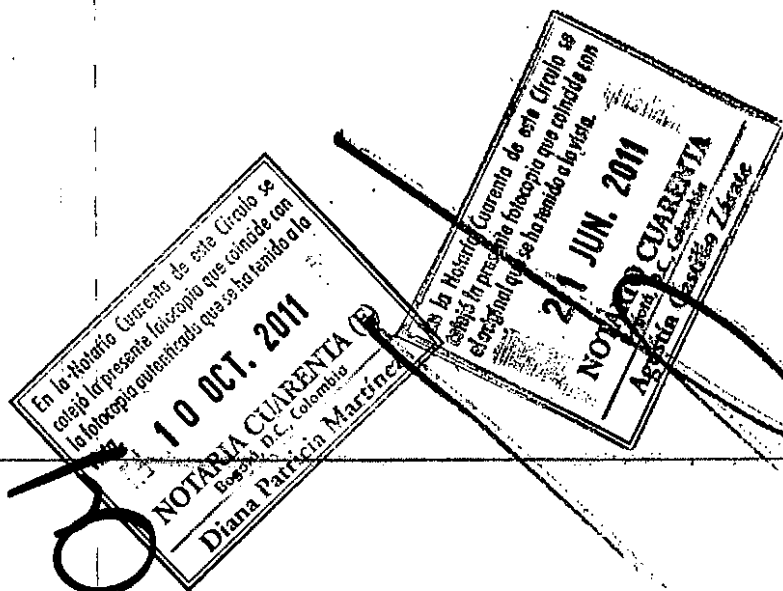
GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo

y Secretaría General.



15

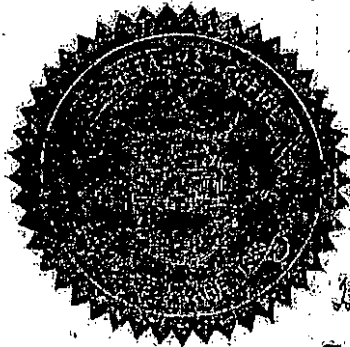
# Apostille

(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. 0254053
9. Seal/Stamp:
10. Signature:

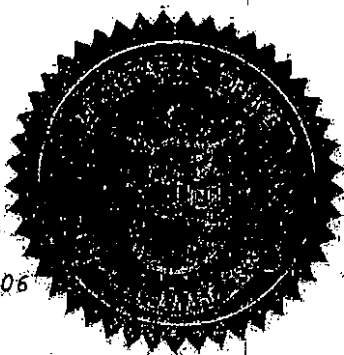


*Harriet Smith Windsor*  
Secretary of State



The First State

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

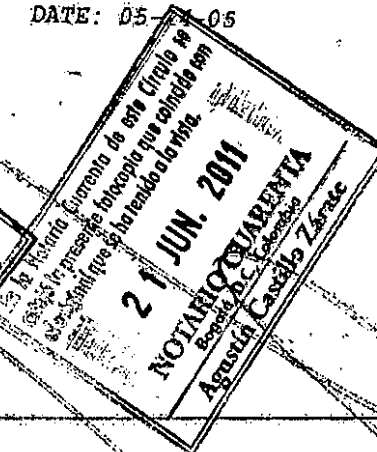
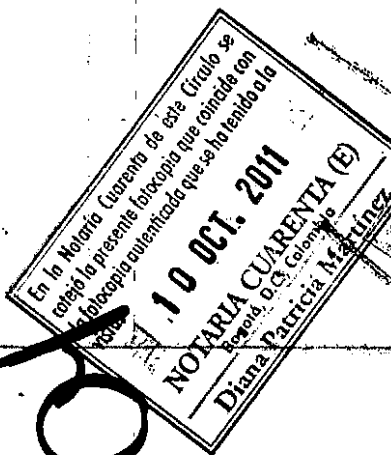


2112549

050426506

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

DATE: 05-1-05



State of Delaware  
Secretary of State  
Division of Corporations  
Delivered 07:44 PM 04/16/2004  
FILED 07:39 PM 04/16/2004  
BRV 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

4133087

lo Notario Cuarenta de este Círculo se  
ajo la presente fotocopia que coincide con  
la copia autenticada que se ha tenido a la  
vista.  
10 OCT. 2011  
NOTARIA CUARENTA (E)  
Bogotá, D.C., Colombia  
Diana Patricia Martínez

lo Notario Cuarenta de este Círculo se  
ajo la presente fotocopia que coincide con  
la copia autenticada que se ha tenido a la vista.  
21 OCT. 2011  
NOTARIO CUARENTA  
Bogotá, D.C., Colombia  
Agustín Castillo Zárate

APOSTILLA

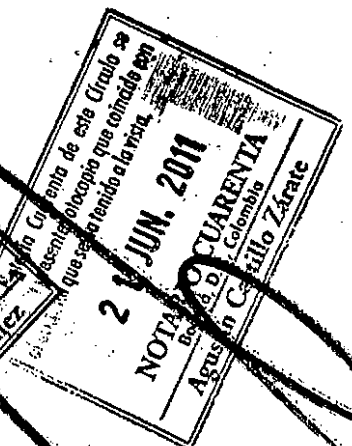
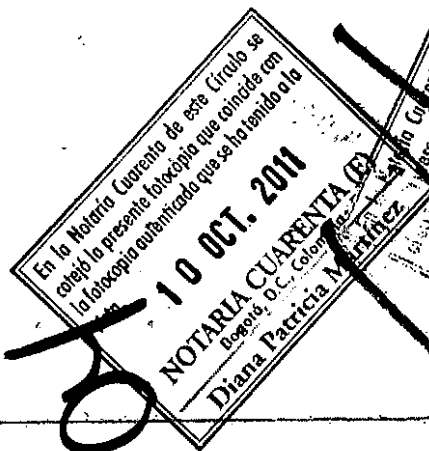
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- 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/tímbré de la Oficina del Secretario de Estado.

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/tímbré
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 DÉCIMOSEXTO DÍA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.

En la Notaría Cuarenta de este Circolo se  
cotejó la presente fotocopia que coincide con  
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la  
vista.

10 OCT. 2011

NOTARIA CUARENTA (E)  
Bogotá, D.C., Colombia

Diana Patricia Martínez

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

En la Notaría Cuarenta de este Circolo 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

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.

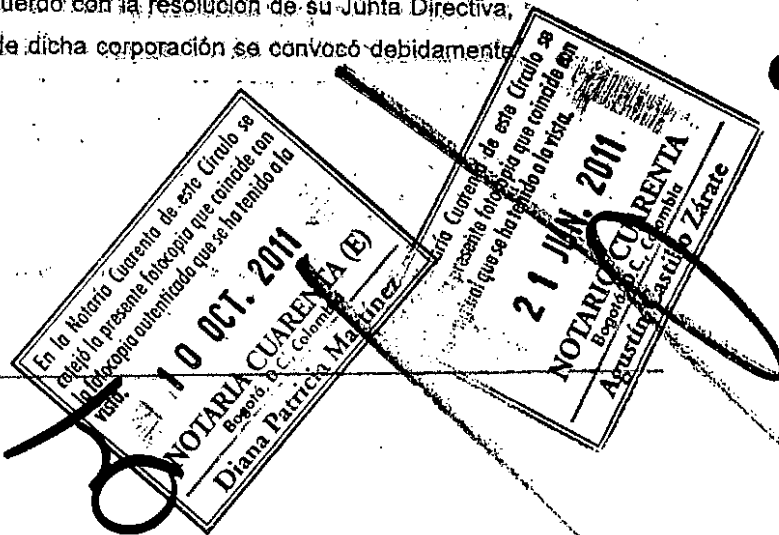
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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.

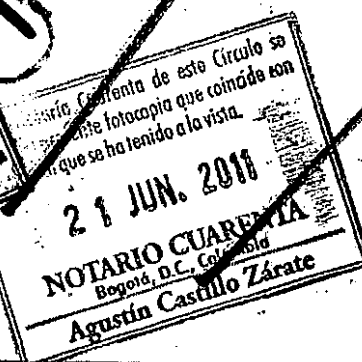
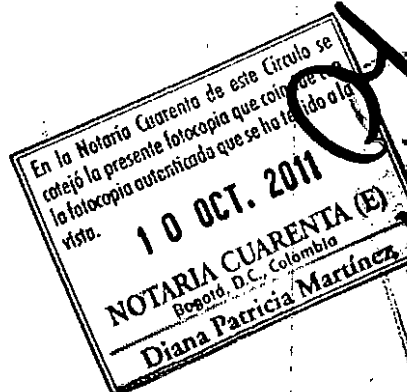
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo  
y Secretaría General.



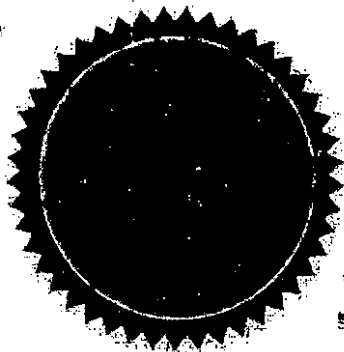
# Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

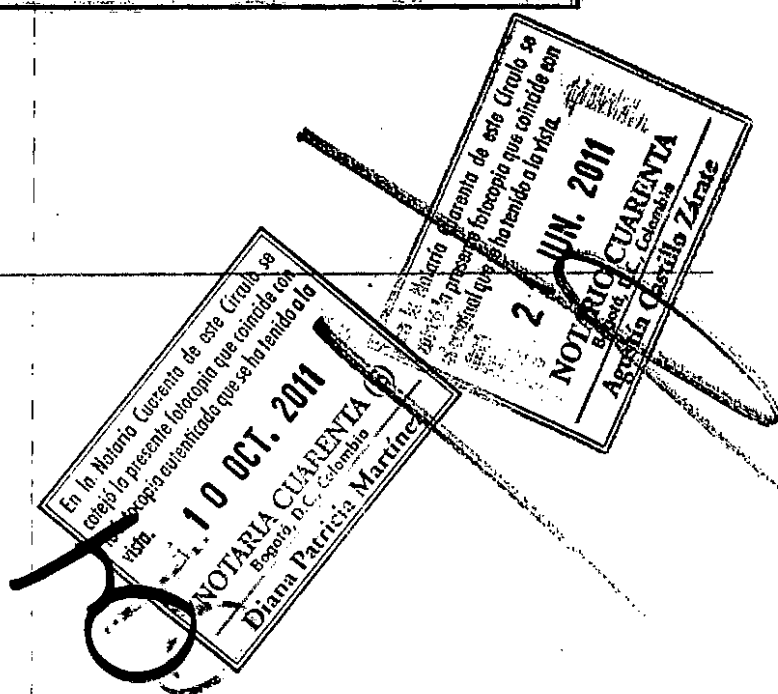
1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware.
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

## 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

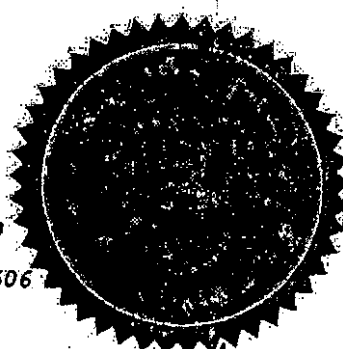
PAGE 1

*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

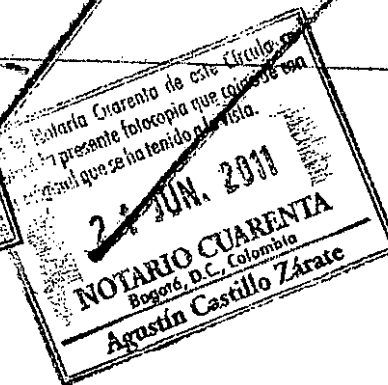
050426506



*Harriet Smith Windsor*

Harriet Smith Windsor, Secretary of State  
AUTHENTICATION: 8900386

DATE: 05-24-05





TRADUCCION AL ESPANOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

**APOSTILLA**

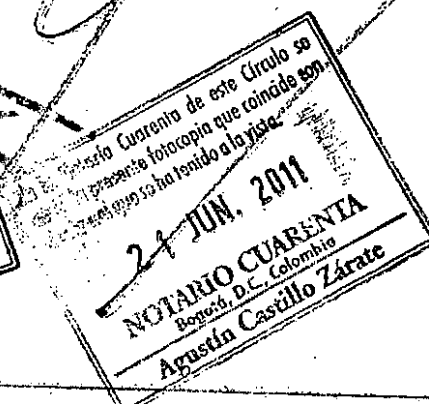
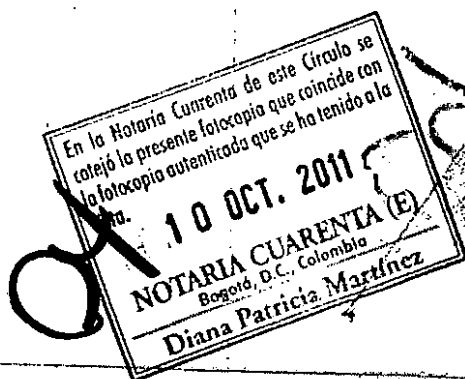
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

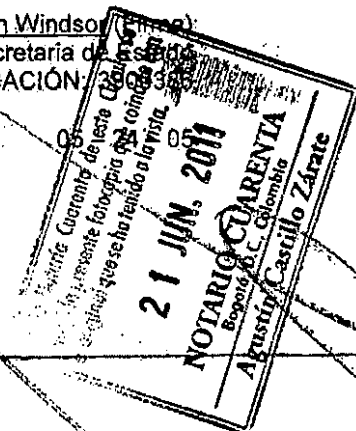
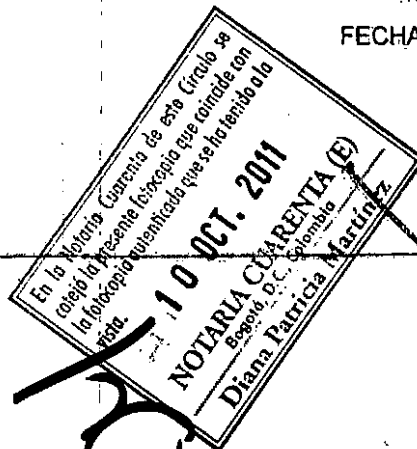


DELAWARE  
EL PRIMER ESTADO

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 (Empleada)  
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 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 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 por los estatutos fueron votados 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.

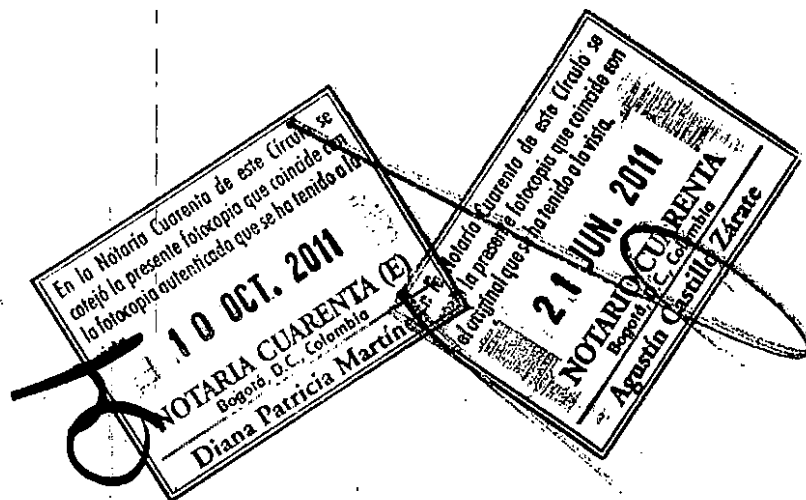
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo  
y Secretaria General.



PATENTE DE INVENCION ☐

MO

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 131

100

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>          | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

|                                              |                                                                                                                         |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una PCT                                                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                     |
| Completa <input checked="" type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                     |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |