



No. 12-029506- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 16:27:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 122

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE

54. TITULO ~~MAMA PREVIAMENTE TRATADO~~ _____

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

GENENTECH, INC.

71. SOLICITANTE _____

SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

DOMICILIO _____

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO _____

22. BOGOTÁ, D.C. _____

AS: 119.844

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-029506- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 16:27:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALJ
Act. 411 PRESENTACION Folios: 122FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco,
CA 94080, Estados Unidos de AméricaNacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
AméricaLugar de Constitución: Estados Unidos de
América

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

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

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

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: SWAMY, Rajeshwari; HAMBLETON, Julie

Dirección: 1060 Haight Street, San Francisco, CA 94117, Estados Unidos de América; 27 Rosewood Drive, San Francisco, CA 94127, Estados Unidos de América; respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América, respectivamente.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/045147

Publicación Internacional No. WO 2011/022264 A1

Fecha 11.08.2010

Fecha 24.02.2011

6 Título (54):

TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE
MAMA PREVIAMENTE TRATADO

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

US

15.08.2009

61/234,281

US

03.12.2009

61/266,343

9 Comprobante de pago No. 12-7681; 12-7709; 12-1643; 12-11541; 12-11542

Fecha 16.02.2012

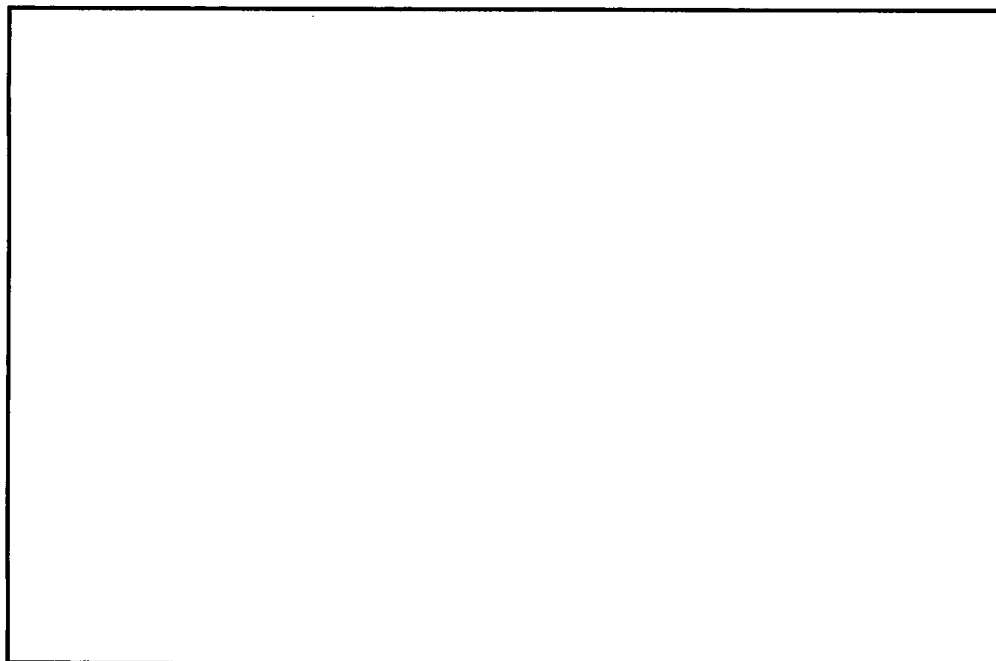
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

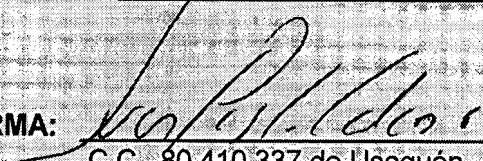
ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 590.000
- ☒ 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.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 34.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 570.000 (19*\$30.000).

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.

AS. 119.844

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 007681
		Bogotá D.C., Enero 26 de 2012 - 16:23:02

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	427028206	26/01/2012	36.735.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

=====

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

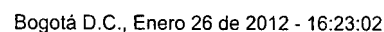
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-029506- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 16:27:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 122

- / -



NI 860.047.372

VR PAGO

CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427028206	26/01/2012	36.735.000,00
--------------	-----------------	-----------	-----------	------------	---------------

Vr.CONCEPTO

1 50005-01-01 SOLICITUDES

998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0
ANTRIOR

300.000.00

300.000.00

\$300.000.00

SON: **TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsible:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-029506- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 16:27:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 122

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

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

, Enero 26 de 2012 - 16:23:09

As. 119.844

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



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0011541

Bogotá D.C., Febrero 03 de 2012 - 17:18:14

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	446274522	02/02/2012	38.767.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	60.000.00	60.000.00
				\$60.000.00

SON: **SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-029506- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 16:27:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 122

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

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

Febrero 3 de 2012 - 17:18:24

As. 119.844

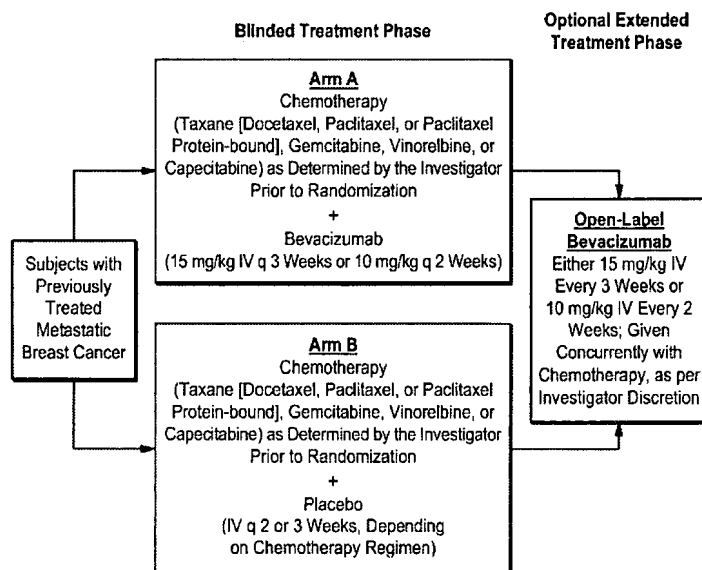
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0011542	
				Bogotá D.C., Febrero 03 de 2012 - 17:18:14	
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.				NI 860.047.372	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	446274522	02/02/2012	38.767.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	60.000.00	60.000.00	
				\$60.000.00	
=====					
SON: **SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
-***-					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-029506- -00000-0000 Fecha: 2012-02-20 16:27:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 122					
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					
, Febrero 3 de 2012 - 17:18:24					

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 February 2011 (24.02.2011)(10) International Publication Number
WO 2011/022264 A1

- (51) **International Patent Classification:**
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) **International Application Number:** PCT/US2010/045147
- (22) **International Filing Date:** 11 August 2010 (11.08.2010)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/234,281 15 August 2009 (15.08.2009) US
61/266,343 3 December 2009 (03.12.2009) US
- (71) **Applicant (for all designated States except AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR, US):** GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).
- (71) **Applicant (for AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR only):** F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).
- (72) **Inventors; and**
- (75) **Inventors/Applicants (for US only):** SWAMY, Rajeshwari [US/US]; 1060 Haight Street, San Francisco, California 94117 (US). HAMBLETON, Julie [US/US]; 27 Rosewood Drive, San Francisco, California 94127 (US).
- (74) **Agents:** FANG, Carol A. 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, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) **Title:** ANTI-ANGIOGENESIS THERAPY FOR THE TREATMENT OF PREVIOUSLY TREATED BREAST CANCER**FIG. 1**

(57) **Abstract:** This disclosure concerns in general treatment of diseases and pathological conditions with anti-VEGF antibodies. More specifically, the disclosure concerns the treatment of human patients susceptible to or diagnosed with cancer using an anti-VEGF antibody, in combination with one or more additional anti-tumor therapeutic agents in previously treated metastatic breast cancer.

WO 2011/022264 A1

(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 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

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

TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA PREVIAMENTE TRATADO

SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reclama prioridad frente a la Solicitud Provisoria Estadounidense con Número de Acta 61/266.343, presentada el 3 de diciembre, 2009 y Solicitud Provisoria Estadounidense con Número de Acta 61/234.281, presentada el 15 de agosto, 2009, y reclama el beneficio de las mismas, cuyas memorias descriptivas son incorporadas a la presente en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere, en general, al tratamiento de enfermedades humanas y afecciones patológicas. Más específicamente, la invención se refiere a la terapia antiangiogénesis, ya sea por sí sola o en combinación con otras terapias anticancerígenas, para el tratamiento del cáncer de mama previamente tratado.

ANTECEDENTES

El cáncer sigue siendo una de las amenazas más mortales para la salud del ser humano. En los Estados Unidos, el cáncer afecta a casi 1.3 millón de pacientes nuevos cada año, y es la segunda causa de muerte después de enfermedad cardíaca, representando aproximadamente 1 de 4 muertes. Se pronostica además que el cáncer puede superar a las enfermedades cardiovasculares como la causa número uno de muerte dentro de 5 años. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de esas muertes. Si bien han habido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos cánceres, la tasa de supervivencia de 5 años general para todos los cánceres ha mejorado solo en aproximadamente 10% en los últimos 20 años. Los cánceres, o tumores malignos, hacen metástasis y crecen rápidamente en forma descontrolada, haciendo a la detección temprana y el tratamiento extremadamente difíciles.

El cáncer de mama es una enfermedad que mata a muchas mujeres por año en los Estados Unidos. De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society), aproximadamente 40.000 morirán de la enfermedad en el 2008. Más de 180.000 casos nuevos de cáncer de mama son diagnosticados anualmente, y se estima que una de ocho mujeres desarrollará cáncer de mama. Estos números indican que el cáncer de mama es una de las enfermedades más peligrosas que enfrentan las mujeres hoy en día. El cáncer de mama metastásico es generalmente incurable y solo unos pocos pacientes logran una supervivencia a largo plazo después de la quimioterapia estándar. Greenberg et al., *J. Clin. Oncol.* 14:2197-2205 (1996).

El conocimiento de la biología básica del cáncer de mama se ha expandido exponencialmente durante las últimas tres décadas y ha tenido un impacto en algunos casos sobre la terapia. Un ensayo en fase II de etiqueta abierta, multinacional de 222 mujeres con cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de HER2 encontró un índice de respuesta del 15% con seis respuestas completas confirmadas utilizando un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante (trastuzumab, también conocido como Herceptin®, Genentech, Sur de San Francisco) dirigido contra HER2 (Cobleigh et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17:97 (1998)). Un ensayo en fase III aleatorizado evaluó la seguridad y eficacia de agregar Herceptin a la quimioterapia de primera línea con paclitaxel o la combinación de doxorubicina más ciclofosfamida. La tasa de respuesta total y el tiempo hasta la progresión mejoraron significativamente con la adición de Herceptin a la quimioterapia en comparación con la quimioterapia por sí sola (Slamon et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17:98 (1998)). La adición de Herceptin prolongó la supervivencia total (Norton et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18:127a (1999)).

Si bien trastuzumab es el primer agente terapéutico, con base biológica, novedoso aprobado para el tratamiento de una subpoblación de pacientes con cáncer de mama que tienen cánceres con sobreexpresión de HER2, diversos otros métodos han demostrado ser prometedores y han entrado en fase de investigación clínica. Sin embargo, existen estimaciones en cuanto a que el 75 por ciento de las mujeres con cáncer de mama metastásico recientemente diagnosticado son HER2-negativas. Los compuestos que inhiben la angiogénesis han generado interés particular para alcanzar poblaciones adicionales con cáncer de mama y han sido y son el objeto de ensayos clínicos tanto en los Estados Unidos como en otros países.

Puesto que el cáncer es aun una de las amenazas más mortales, se necesitan tratamientos adicionales contra el cáncer para los pacientes. La invención cubre estas y otras necesidades, y se pondrá en evidencia luego de la revisión de la siguiente descripción.

SÍNTESIS

Se proporcionan usos de un anticuerpo anti-VEGF para tratar eficazmente pacientes con cáncer de mama con cáncer de mama metastásico previamente tratado. En particular, la invención proporciona datos de un ensayo clínico en fase III aleatorizado de bevacizumab (AVASTIN®) en combinación con regímenes de quimioterapia en sujetos con cáncer de mama metastásico previamente tratado en

sujetos humanos. Dichos regímenes de quimioterapia incluyen terapia con taxano (por ej., paclitaxel cada 3 semanas o semanalmente, partículas unidas a proteína de paclitaxel (por ej., Abraxane®) o docetaxel), terapia con gemcitabina, vinorelbina o capecitabina. El éxito del ensayo muestra que agregar anticuerpo anti-VEGF a la quimioterapia proporciona beneficios estadísticamente significativos y clínicamente importantes como una terapia de segunda línea para pacientes con cáncer de mama previamente tratado.

Los resultados obtenidos en estudios clínicos del uso de bevacizumab en sujetos humanos con cáncer de mama metastásico muestran que la eficacia, según lo evaluado por supervivencia libre de progreso (PFS, siglas en inglés correspondientes a "progression free survival") era positiva especialmente cuando se comparó con datos de PFS para agentes quimioterapéuticos solos. Los sujetos en los ensayos clínicos quienes recibieron bevacizumab en combinación con quimioterapia (terapia con taxanos, capecitabina, gemcitabina o vinorelbina) tuvieron un aumento en la supervivencia libre de progreso en comparación con los sujetos tratados con quimioterapia por sí sola. La diferencia fue significativamente importante.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para tratar a un paciente diagnosticado con cáncer de mama metastásico previamente tratado, que comprende someter al paciente a un régimen de tratamiento que combina una quimioterapia con la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF. El régimen de tratamiento que combina la quimioterapia con la administración del anti-VEGF extiende eficazmente la supervivencia libre de progreso (PFS) del paciente.

En ciertas realizaciones, la PFS se extiende aproximadamente 0,5 mes, 1 mes, 1,2 meses, 2 meses, 2,1 meses, 2,2 meses, 2,8 meses, 3 meses, etc. En una realización, la PFS se extiende aproximadamente 2,1 meses. En una realización, la PFS se extiende aproximadamente 2,2 meses. En una realización, la PFS se extiende aproximadamente 2,8 meses.

Puede utilizarse de acuerdo con la invención cualquier agente quimioterapéutico que exhibe actividad anticancerígena. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo formado por agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores relacionados, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, antibióticos, L-Asparaginasa, inhibidor de topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación de platino, urea sustituida con

antracénodiona, derivados de metilhidrazina, supresor adrenocortical, adrenocorticosteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógeno, andrógenos, antiandrógeno, y análogo de la hormona liberadora de gonadotropina. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es por ejemplo, capecitabina, taxano, paclitaxel, docetaxel, paclitaxel partículas unidas a proteínas (por ej., Abraxane®), gemcitabina, vinorelbina o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es por ejemplo, capecitabina, taxano, paclitaxel, docetaxel, paclitaxel partículas unidas a proteínas (por ej., Abraxane®), gemcitabina, o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es por ejemplo, capecitabina, taxano, paclitaxel, docetaxel, paclitaxel como partículas unidas a proteínas (por ej., Abraxane®), o combinaciones de los mismos. Pueden emplearse dos o más agentes quimioterapéuticos en un cóctel a ser administrado en combinación con la administración del anticuerpo anti-VEGF.

Los beneficios clínicos de los tratamientos de acuerdo con la invención pueden medirse por, por ejemplo, la duración de la supervivencia libre de progreso (PFS), tiempo a la falla del tratamiento, índice de respuesta objetivo y duración de respuesta.

Por consiguiente, la invención presenta un método para instruir a un sujeto humano con cáncer por ej., de mama, previamente tratado proporcionando instrucciones para recibir tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF de modo de aumentar la supervivencia libre de progreso del sujeto, para disminuir el riesgo del sujeto de recurrencia de cáncer o de aumentar la probabilidad del sujeto de supervivencia. En algunas realizaciones, el método comprende además proporcionar instrucciones para recibir tratamiento con al menos un agente quimioterapéutico. El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF puede ser administrado en forma concurrente o consecutiva con el tratamiento con el agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, el sujeto es tratado según lo instruido por el método de instrucción.

La invención proporciona además un método promocional, que comprende promover la administración de un anticuerpo anti-VEGF para tratamiento de cáncer por ej., de mama, previamente tratado, en un sujeto humano. En algunas realizaciones, el método comprende además promover la administración de por lo menos un agente quimioterapéutico. La administración del anticuerpo anti-VEGF puede ser en forma concurrente o consecutiva a la administración del agente quimioterapéutico. La promoción puede llevarse a cabo por cualquier medio

disponible. En algunas realizaciones, la promoción es mediante un inserto en el paquete que acompaña una formulación comercial del anticuerpo anti-VEGF. La promoción también puede ser mediante un inserto de paquete que acompaña una formulación comercial del agente quimioterapéutico. La promoción puede ser por escrito o comunicación oral a un médico o persona encargada del cuidado de la salud. En algunas realizaciones, la promoción es mediante un inserto en el paquete donde el inserto del paquete proporciona instrucciones para recibir terapia con anticuerpo anti-VEGF. En algunas realizaciones, la promoción es seguida por el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con o sin el agente quimioterapéutico.

La invención proporciona un método comercial, que comprende comercializar un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento del cáncer por ej., de mama, previamente tratado, en un ser humano de modo de aumentar la supervivencia libre de progreso, o disminuir la probabilidad del sujeto de recurrencia del cáncer o aumentar la probabilidad de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende además comercializar un agente quimioterapéutico para utilizar en combinación con el anticuerpo anti-VEGF. En algunas realizaciones, la comercialización es seguida por el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con o sin el agente quimioterapéutico.

También se proporciona un método comercial, que comprende comercializar un agente quimioterapéutico en combinación con un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento de cáncer por ej. de mama, previamente tratado en un ser humano de modo de aumentar la supervivencia libre de progreso, o disminuir la probabilidad del sujeto de recurrencia del cáncer o aumentar la probabilidad de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, la comercialización es seguida por tratamiento del sujeto con la combinación del agente quimioterapéutico y el anticuerpo anti-VEGF.

En cada uno de los métodos de la invención, el anticuerpo anti-VEGF puede ser sustituido con un antagonista específico de VEGF, por ej., una molécula receptora de VEGF o molécula receptora de VEGF quimérica según lo descrito más adelante. En ciertas realizaciones de los métodos de la invención, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab. El anticuerpo anti-VEGF, o su fragmento de unión al antígeno, puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo totalmente humano o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos ejemplares útiles en los métodos de la invención incluyen bevacizumab (AVASTIN®), un anticuerpo G6, un anticuerpo B20, y sus

fragmentos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF tiene una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWYF DWWGQGT LVT VSS (SEC ID NO. 1)

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

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVL IYF
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEC ID NO. 2).

El anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, también puede ser un anticuerpo que carece de una porción Fc, un F(ab')₂, un Fab, o una estructura Fv.

En una realización, el tratamiento es una combinación de un antagonista específico de VEGF, por ej., anticuerpo anti-VEGF, y por lo menos un agente quimioterapéutico.

Cada uno de los métodos de la invención puede ser practicado con relación al tratamiento de cánceres que incluyen, aunque sin limitarse a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos más particulares de ese tipo de cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer gástrico, melanoma, y diversos tipos de cáncer de cuello y cabeza. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de mama previamente tratado metastásico HER2-negativo.

Cada uno de los aspectos antes mencionados puede incluir además monitorear al sujeto para recurrencia del cáncer. El monitoreo puede lograrse, por ejemplo, evaluando la supervivencia libre de progreso (PFS) o la supervivencia total (OS, siglas en inglés correspondientes a "overall survival") o índice de respuesta objetiva (ORR, siglas en inglés correspondientes a "objective response

rate"). En una realización, la PFS o la OS o el ORR se evalúa después del inicio del tratamiento.

Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, las dosis preferidas para el anticuerpo anti-VEGF, por ej., bevacizumab, son descritas en esta invención y pueden oscilar entre aproximadamente $1\mu\text{g/kg}$ y aproximadamente 50 mg/kg , con máxima preferencia entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg , incluyendo aunque sin limitarse a 5 mg/kg , $7,5\text{ mg/kg}$, 10 mg/kg o 15 mg/kg . La frecuencia de administración variará dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad. Para administraciones repetidas durante varios días o tiempos más largos, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que el cáncer es tratado o hasta lograrse el efecto terapéutico deseado, según lo medido mediante los métodos descritos en esta invención o conocidos en la técnica. En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF de la invención es administrado una vez por semana, cada dos semanas, o cada tres semanas, en un rango de dosis entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg , incluyendo aunque sin limitarse a 5 mg/kg , $7,5\text{ mg/kg}$, 10 mg/kg o 15 mg/kg . Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de la terapia de la invención es fácilmente monitoreado mediante técnicas y ensayos convencionales.

En realizaciones adicionales de cada uno de los aspectos antes mencionados, el antagonista específico de VEGF, por ej., anticuerpo anti-VEGF es administrado local o sistémicamente (por ej., oral o intravenosamente). En otras realizaciones, un aspecto del tratamiento es con el antagonista específico de VEGF en fase extendida de tratamiento o terapia de mantenimiento, según lo evaluado por el médico clínico o descrito en esta invención.

En otras realizaciones, el tratamiento con el antagonista específico de VEGF para el cáncer de mama metastásico previamente tratado es en combinación con una terapia anticancerígena adicional, incluyendo, aunque sin limitarse a, cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia diferenciadora, bioterapia, inmunoterapia, un inhibidor de angiogénesis, un agente citotóxico y un compuesto antiproliferativo. El tratamiento con el antagonista específico de VEGF también puede incluir cualquier combinación de los tipos antes mencionados de regímenes terapéuticos. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico y el antagonista específico de VEGF son administrados concurrentemente.

En las realizaciones las cuales incluyen una terapia anticancerígena adicional, el sujeto puede ser adicionalmente tratado con la terapia

anticancerígena adicional antes, durante (por ej., simultáneamente), o después de la administración del antagonista específico de VEGF. En una realización, el antagonista específico de VEGF, administrado solo o con una terapia anticancerígena, puede ser administrado como terapia de mantenimiento.

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

Figura 1 ilustra el diseño del estudio para el ensayo de cáncer de mama metastásico previamente tratado utilizando bevacizumab (Brazo A) o placebo (Brazo B) con diversas quimioterapias.

Figura 2 ilustra el análisis de punto final primario de PFS del estudio en la Figura 1.

Figura 3 ilustra los análisis específicos de cohorte de PFS del estudio en la Figura 1.

Figura 4 ilustra la tasa de respuesta objetiva del estudio en la Figura 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. DEFINICIONES

El término "VEGF" o "VEGF-A" se emplea para hacer referencia al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 165 aminoácidos y factores de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 121, 145, 189 y 206 aminoácidos relacionados, según lo descrito por, por ej., Leung et al. *Science*, 246:1306 (1989), y Houck et al. *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991), junto con sus formas alélicas y procesadas naturales. VEGF-A es parte de una familia de genes que incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, y PIGF. VEGF-A se une principalmente a dos tirosina quinasas receptoras de alta afinidad, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), siendo este último el mayor transmisor de señales mitogénicas de células endoteliales vasculares de VEGF-A. Adicionalmente, neuropilina-1 ha sido identificada como un receptor para isoformas de VEGF-A de unión a heparina, y puede jugar un rol en el desarrollo vascular. El término "VEGF" o "VEGF-A" también se refiere a VEGFs de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. Algunas veces, el VEGF de una especie específica es indicado por términos tales como hVEGF para VEGF humano o mVEGF para VEGF murino. El término "VEGF" es también empleado para hacer referencia a las formas truncadas o fragmentos del polipéptido que comprenden aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células

endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de esas formas de VEGF puede ser identificada en la solicitud, por ej., por "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" o "VEGF165." Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativo "truncado" son numeradas según lo indicado en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en VEGF nativo truncado es también posición 17 (metionina) en VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene afinidad de unión para los receptores KDR y Flt-1 en comparación 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 unir hVEGF con un valor K_d de entre 100 nM-1 pM. Las afinidades con el anticuerpo pueden ser determinadas mediante un ensayo basado en resonancia de plasmón de superficie (tal como el ensayo BIAcore según lo descrito en la Publicación de Solicitud PCT No. WO2005/012359); ensayo de inmunoabsorbancia vinculado con enzima (ELISA); y ensayos de competición (por ej. RIA's), por ejemplo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede ser empleado como un agente terapéutico en el direccionamiento e interferencia con enfermedades o afecciones donde está involucrada la actividad del VEGF. Asimismo, el anticuerpo puede ser sometido a otros ensayos de actividad biológica, por ej., a fin de evaluar su eficacia como un agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno objetivo y del uso pretendido para el anticuerpo. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitarse a, el ensayo de inhibición de HUVEC; ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (según lo descrito en WO 89/06692, por ejemplo). Un anticuerpo anti-VEGF generalmente no se unirá a otros homólogos del VEGF tal como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores del crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF.

Un "antagonista del VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades del VEGF incluyendo su unión a uno o más receptores del VEGF. Los antagonistas del VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF y sus fragmentos de unión al antígeno, moléculas receptoras y derivados los cuales se unen específicamente a VEGF secuestrando de ese modo su unión a uno o más receptores, anticuerpos de receptores anti-VEGF y antagonistas de receptores del VEGF tales como inhibidores de moléculas pequeñas de las VEGFR tirosina quinasas.

Un polipéptido de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido derivado de la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de polipéptido de presentación natural de cualquier mamífero. Ese tipo de polipéptido de secuencia nativa puede ser aislado de la naturaleza o puede ser producido por medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de "secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas de presentación natural del polipéptido (*por ej.*, una secuencia de dominio extracelular), las formas variantes de presentación natural (*por ej.*, las formas cortadas y empalmadas alternativamente) y variantes alélicas de presentación natural del polipéptido.

Una "variante" de polipéptido significa un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos donde uno o más residuos de aminoácidos son agregados, o suprimidos, en el término N o C del polipéptido. Comúnmente, una variante tendrá al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente por lo menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, e incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa.

El término "anticuerpo" se emplea en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpo policlonales, anticuerpo multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (*por ej.*, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos (ver más adelante) siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada.

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

El "Kd" o "valor Kd" de acuerdo con esta invención es en una realización medido por un ensayo de unión del VEGF radioetiquetado (RIA) llevado a cabo con la versión Fab del anticuerpo y una molécula del VEGF según lo descrito

mediante el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión de la solución de Fabs para VEGF equilibrando Fab con una concentración mínima de VEGF (^{125}I)-etiquetado (109) en presencia de una serie de titulación de VEGF no etiquetado, luego capturando VEGF unido con una placa revestida con anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). En un ejemplo, para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtítulo (Dynex) son recubiertas durante toda la noche con 5 ug/ml de un anticuerpo anti-Fab capturante (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente bloqueado con 2% (p/v) de seroalbúmina bovina en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM [^{125}I]VEGF(109) se mezclan con diluciones seriadas de un Fab de interés, por ej., Fab-12 (Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). El Fab de interés es luego incubado durante toda la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante 65 horas para asegurar que se alcance el equilibrio. A continuación, las mezclas son transferidas a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente durante una hora. Luego, la solución es extraída y la placa se lava ocho veces con 0,1% Tween-20 en PBS. Cuando las placas se habían secado, se agrega 150 ul/pocillo de agente de centelleo (MicroScint-20; Packard), y las placas son contadas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que brindan menos de o igual a 20% de unión máxima se eligen para utilizar en ensayos de unión competitivos. De acuerdo con otra realización, el K_d o valor K_d se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcoreTM-2000 o un BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de hVEGF inmovilizado (8-109) a ~10 unidades de respuesta (RU, según sus siglas en inglés). 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. VEGF humano se diluye con acetato sódico 10mM, pH 4,8, en 5 ug/ml (~0,2uM) antes de inyección a un índice de flujo de 5 ul/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección de VEGF humano, se inyecta etanolamina 1M para bloquear grupos sin reaccionar. Para mediciones de la cinética, se inyectan diluciones seriadas dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% Tween 20 (PBST) a 25°C a un índice de flujo de aproximadamente 25ul/min. Se calculan los índices de asociación ($k_{\text{encendido}}$) y los índices de disociación (k_{apagado}) utilizando

un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (versión de Programa Informático de Evaluación BIAcore Evaluation Software 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y de disociación. Se calculó la constante de disociación de equilibrio (K_d) como la relación $k_{\text{apagado}}/k_{\text{encendido}}$. Ver, por ej., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Si el índice encendido excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces el índice encendido puede ser determinado utilizando una técnica de templado fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm pase de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-VEGF 20nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de la forma corta de VEGF humano (8-109) o VEGF de ratón según lo medido en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada. El " K_d " o "valor K_d " de acuerdo con esta invención, en una realización, se mide mediante técnicas conocidas en el arte.

Un anticuerpo de "bloqueo" o "antagonista" de anticuerpo es uno el cual inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que une. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista específico de VEGF se une a VEGF e inhibe la capacidad de VEGF de inducir la proliferación de células endoteliales vasculares o de inducir la permeabilidad vascular. Los anticuerpos de bloqueo preferidos o anticuerpos antagonistas inhiben por completo la actividad biológica del antígeno.

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

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, incluyendo generalmente un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y reteniendo de ese modo la capacidad de unión al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo abarcados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', el cual 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 de cisteína en el término C del dominio CH1; (v) el fragmento Fv que tiene los

dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)) el cual consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente incluyendo dos fragmentos Fab' ligados mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo de cadena única (por ej., Fv de cadena única; 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 al antígeno, que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (ver, *por ej.*, 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 segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) los cuales, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno (Zapata *et al.* *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995); y Patente Estadounidense No. 5.641.870).

El término "anticuerpo monoclonal" como se emplea en esta invención, 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 por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un antígeno simple. Por añadidura, en contraste con las preparaciones de los anticuerpos policlonales que incluyen típicamente anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe ser interpretado como requiriendo la producción del anticuerpo por cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser utilizados de acuerdo con la invención pueden ser preparados mediante el método del hibridoma primer descrito por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o puede ser preparado mediante métodos de ADN recombinante (ver, *por ej.*, la Patente Estadounidense No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de genotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) o Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo el cual contiene un reconocimiento de antígeno completo y sitio de unión. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y una cadena ligera en

asociación estrecha, que puede ser covalente por naturaleza, por ejemplo en scFv. Es en esta configuración que las tres CDRs e cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . Colectivamente, las seis CDRs o un subconjunto de la misma confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aun un dominio variable único (o mitad de un Fv que comprende solamente tres CDRs específicamente para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unión el antígeno, si bien generalmente a una afinidad inferior que el sitio de unión entero.

Como se emplea en esta invención, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las porciones de las cadenas ligera y pesada de moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDRs; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3), y Regiones de Estructura (FRs). V_H se refiere al dominio variable de la cadena pesada. V_L se refiere al dominio variable de la cadena ligera. De acuerdo con los métodos empleados en esta invención, las posiciones de aminoácidos asignadas a CDRs y FRs pueden ser definidas de acuerdo con Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). La numeración de aminoácidos de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno es también de acuerdo con la de Kabat.

Como se emplea en esta invención, el término "Regiones Determinantes de la Complementariedad" (CDRs; 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 al antígeno. Cada dominio variable típicamente tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de la complementariedad puede comprender residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" según lo definido por Kabat (es decir aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera 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)) y/o aquellos residuos de un "lazo hipervariable" (es decir, aproximadamente los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). En algunos casos, una región determinante de la complementariedad puede incluir aminoácidos tanto de una región CDR definida

de acuerdo con Kabat como un lazo hipervariable. Por ejemplo, la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo 4D5 incluye los aminoácidos 26 a 35.

“Regiones estructurales” (en adelante FR) son aquellos residuos de dominio variable que no son los residuos de CDR. Cada dominio variable típicamente tiene cuatro FRs identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDRs son definidas de acuerdo con Kabat, los residuos FR de cadena ligera están posicionados a aproximadamente residuos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3), y 98-107 (LCFR4) y los residuos de FR de cadena pesada están posicionados 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 CDRs comprenden residuos de aminoácidos de lazos hipervariables, los residuos de FR de cadena ligera están posicionados aproximadamente en los residuos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3), y 97-107 (LCFR4) en los residuos de FR de cadena ligera y de la cadena pesada están posicionados 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 según lo definido por Kabat como aquellos de un lazo hipervariable, los residuos de FR serán ajustados concordantemente. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los residuos FR1 de cadena pesada están en posiciones 1-25 y los residuos FR2 están en las posiciones 36-49.

El fragmento “Fab” contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera 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 los cuales están generalmente ligados en forma covalente cerca de su terminales carboxi por cisteínas bisagra entre los mismos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo son también conocidos en la técnica.

Fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena única” o “scFv” comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica única. En general, el polipéptido Fv comprende además un ligante polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , lo cual permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, dichos fragmentos comprenden un dominio

variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H y V_L). Utilizando un ligante que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos son descritos más completamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H - C_H1 - V_H - C_H1) los cuales, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos monoclonales en esta invención incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en donde una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a, u homóloga a, secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico con, u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada (Patente Estadounidense No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ej., murinos) son anticuerpos quiméricos los cuales contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en donde los residuos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura Fv (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Por añadidura, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos los cuales no son encontrados en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones son hechas para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo

humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de los lazos hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las región FR son aquellos de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá por lo menos una porción de un región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase 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 aminoácido la cual corresponde con aquella de un anticuerpo producido por un humano y/o ha sido preparado utilizando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos según lo descrito en esta invención. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden ser producidos utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona entre una genoteca de fagos, donde esta 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 y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Los anticuerpos humanos también pueden ser preparados introduciendo lugares de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ej., ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Luego del desafío, se observa producción de anticuerpos humanos, lo cual se asemeja estrechamente a lo observado en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo redistribución de genes, ensamble y repertorio de anticuerpos. Este método es descrito, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 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 y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano puede ser preparado por medio de la immortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido

contra un antígeno objetivo (dichos linfocitos B pueden ser recuperados de un individuo o pueden haber sido inmunizados in vitro). Ver, por ej., 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 Estadounidense No. 5.750.373.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más de sus CDRs lo cual da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental el cual no posee aquella(s) alteracion(es). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad son producidos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de CDR y/o residuos estructurales es descrita 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 al antígeno funcional" de un anticuerpo es aquel el cual es capaz de unión a un antígeno objetivo. La afinidad de unión al antígeno del sitio de unión al antígeno no es necesariamente tan fuerte como el anticuerpo parental del cual el sitio de unión al antígeno deriva, pero la capacidad de unión al antígeno debe poderse medir utilizando cualquiera de una variedad de métodos conocidos para evaluar la unión del anticuerpo a un antígeno. Por añadidura, la afinidad de unión al antígeno de cada uno de los sitios de unión al antígeno de un anticuerpo multivalente en esta invención no necesariamente debe ser cuantitativamente igual. Para los anticuerpos multiméricos de esta invención, la cantidad de sitios de unión al antígeno funcionales puede ser evaluada utilizando análisis de ultracentrifugación según lo descrito en el Ejemplo 2 de la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 20050186208. De acuerdo con este método de análisis, se combinan diferentes relaciones de antígeno objetivo a anticuerpo multimérico y el peso molecular promedio de los complejos se calcula asumiendo diferentes números de sitios de unión funcionales. Estos valores teóricos son comparados 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 el cual posee una o más de las características biológicas de

ese anticuerpo que lo distingue de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

A fin de seleccionar anticuerpos los cuales se unen a un epítipo en un antígeno unido por un anticuerpo de interés, se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como aquel descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988).

Un "anticuerpo dependiente de la especie" es aquel que tiene una afinidad de unión más fuerte para un antígeno de una primera especie mamífero que la que tiene para un homólogo de ese antígeno de una segunda especie mamífera. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie "se une específicamente" a un antígeno humano (*por ej.*, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, o no más de aproximadamente 1×10^{-8} M o no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) aunque tiene una afinidad de unión para un homólogo del antígeno de una segunda especie mamífera no humana la cual es por lo menos aproximadamente 50 veces, o por lo menos aproximadamente 500 veces, o por lo menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión para el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos según lo definido anteriormente, pero típicamente es un anticuerpo humanizado o humano.

Como se emplea en esta invención, "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 de 100% de identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo dependiente de la especie. En una realización, la mutante del anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 75% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera 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 máxima preferencia por lo menos 95%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia es definida en esta invención como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidato que son idénticos (es decir, mismo residuo) o similares (es decir, residuo de aminoácidos del mismo grupo en base a propiedades de cadenas laterales comunes, ver más abajo) con los residuos de anticuerpos dependientes de la especie, después de alinear las secuencias e

introducir espacios vacíos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, supresiones o inserciones de terminal N, terminal C o internas en la secuencia de anticuerpo fuera del dominio variable será interpretada como afectando la identidad o similitud de secuencia.

Para aumentar la vida media de los anticuerpos o polipéptido que contiene las secuencias de aminoácidos de esta invención, se puede unir un epítipo de unión al receptor de salvamento al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), según lo descrito, por ej., en Patente Estadounidense N° 5.739.277. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de unión al receptor de salvamento puede ser ligada en marco a un ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de esta invención de modo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico construida por ingeniería genética comprenda el epítipo de unión al receptor de salvamento y una secuencia polipeptídica de esta invención. Como se emplea en esta invención, el término "epítipo de unión al receptor de salvamento" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable del aumento de la vida media sérica *in vivo* de la molécula de IgG (por ej., Ghetie et al., *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), Tabla 1). Los anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y vidas medias séricas aumentadas son también descritos en WO 00/42072, WO 02/060919; Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 (2004)). En otra realización, la vida media sérica también puede ser aumentada, por ejemplo, uniendo otras secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, los anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los métodos de la invención pueden ser unidos a albúmina sérica o a una porción de seroalbúmina que se une al receptor FcRn o un péptido de unión a seroalbúmina de modo que la seroalbúmina se una al anticuerpo o al polipéptido, por ej., dichas secuencias polipeptídicas son descritas en WO01/45746. En una realización, el péptido de seroalbúmina a ser unido comprende una secuencia de aminoácidos de DICLPRWGCLW. En otra realización, la vida media de un Fab es aumentada mediante estos métodos. Véase además, Dennis et al. *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) para secuencias peptídicas de unión a seroalbúmina.

Una "proteína de receptor del VEGF quimérica" es una molécula receptora del VEGF que tiene secuencias de aminoácidos derivadas de por lo menos dos proteínas diferentes, por lo menos uno de los cuales es como proteína receptora del VEGF. En ciertas realizaciones, la proteína receptora del VEGF quimérica es

capaz de unirse a, e inhibir, la actividad biológica de VEGF.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medioambiente natural. Los componentes contaminantes de su medioambiente natural son materiales que interferirían 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 estará purificado (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo según lo determinado por el método Lowry, y con máxima preferencia más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos de terminal N o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o no reductoras utilizando coloración con azul Coomassie o con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes puesto que por lo menos un componente del medioambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, sin embargo, el anticuerpo aislado será preparado por, por lo menos, un paso de purificación.

Por "fragmento" se quiere decir 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 de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 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 antiangiogénesis" o "inhibidor de angiogénesis" se refiere a una sustancia de peso molecular pequeño, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis, o permeabilidad vascular indeseable, ya sea en forma directa o indirecta. Debería entenderse que el agente antiangiogénesis incluye aquellos agentes que unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico según lo definido a lo largo de la memoria descriptiva o conocido en la técnica, por ej., pero no se limitan a, anticuerpos contra VEGF-A o contra el receptor de VEGF-A (por ej., receptor KDR y/o receptor Flt-1), trampa de VEGF, inhibidores anti-PDGFR tales como GleevecTM (Mesilato de Imatinib). Los

agentes antiangiogénesis también incluyen inhibidores de angiogénesis nativos, por ej., angiostatina, endostatina, etc. Ver, por ej., Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ej., Tabla 3 que enlista la terapia antiangiogénica en melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5:1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ej., la Tabla 2 que enlista factores antiangiogénicos conocidos); y Sato. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por ej., la Tabla 1 enlista agentes antiangiogénicos empleados en ensayos clínicos).

Una dosis de "mantenimiento" en esta invención se refiere a una o más dosis de un agente terapéutico administrado al paciente luego o después de un período de tratamiento. En general, las dosis de mantenimiento son administradas a intervalos de tratamiento espaciados, tales como aproximadamente por semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas o aproximadamente cada 4 semanas.

"Supervivencia" se refiere al paciente que permanece con vida, e incluye la supervivencia libre de progreso (PFS) y supervivencia total (OS). La supervivencia puede ser estimada mediante el método Kaplan-Meier, y cualquier diferencia en la supervivencia se computa utilizando el ensayo de rango log estratificado.

"Supervivencia libre de progreso (PFS)" se refiere al tiempo desde el tratamiento (o aleatorización) hasta el primer progreso de la enfermedad o la muerte. Por ejemplo, es el tiempo que el paciente permanece con vida, sin retorno del cáncer, por ej., durante un período de tiempo definido tal como aproximadamente 0,5 meses, 1 mes, 2 meses, 2,1 meses, 2,2 meses, 2,8 meses, 3 meses, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En una realización, la PFS se extiende aproximadamente 2,1 meses. En un aspecto de la invención, PFS puede evaluarse mediante Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST, siglas correspondientes a "Response Evaluation Criteria in Solid Tumors").

La "supervivencia total" se refiere al paciente que permanece con vida durante un período de tiempo definido, tal como aproximadamente 1 año, alrededor de 2 años, alrededor de 3 años, alrededor de 4 años, alrededor de 5 años, alrededor de 10 años, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial.

Por "extender la supervivencia" o "aumentar la probabilidad de supervivencia" se quiere decir aumentar la PFS y/o OS en un paciente tratado con

relación a un paciente sin tratar (es decir, con relación a un paciente no tratado con un antagonista específico de VEGF, por ej., un anticuerpo de VEGF), o con relación a un protocolo de tratamiento de control, tal como el tratamiento solamente con agente quimioterapéutico, tal como aquellos empleados en el tratamiento del cáncer de mama. La supervivencia es monitoreada durante por lo menos aproximadamente un mes, dos meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, o por lo menos aproximadamente 1 año, o por lo menos aproximadamente 2 años, o por lo menos aproximadamente 3 años, o por lo menos aproximadamente 4 años, o por lo menos aproximadamente 5 años, o por lo menos aproximadamente 10 años, etc., luego del inicio del tratamiento o luego del diagnóstico inicial.

La relación de peligro (HR) es una definición estadística para tasas de eventos. Para el propósito de la invención, la relación de peligro se define como representando la probabilidad de un evento en el brazo experimental dividido por la probabilidad de un evento en el brazo de control en cualquier punto en el tiempo específico. La "relación de peligro" en el análisis de supervivencia libre de progreso es un resumen de la diferencia entre dos curvas de supervivencia libre de progreso, representando la reducción en el riesgo de muerte en tratamiento en comparación con el control, durante un período de seguimiento.

El término "concurrentemente" se emplea en esta invención para hacer referencia a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde por lo menos parte de la administración se superpone en el tiempo. Por lo tanto, la administración concurrente incluye un régimen de dosificación cuando la administración de uno o más agente(s) continúa después de discontinuar la administración de uno o más otro(s) agente(s).

Por "terapia de mantenimiento" se quiere indicar un régimen terapéutico que es proporcionado para reducir la probabilidad de recurrencia o progreso de la enfermedad. La terapia de mantenimiento puede ser proporcionada durante cualquier longitud de tiempo, incluyendo períodos de tiempo extendidos durante toda la vida del sujeto. La terapia de mantenimiento puede ser proporcionada después de la terapia inicial o en conjunto con terapias iniciales o adicionales. Las dosificaciones empleadas para la terapia de mantenimiento pueden variar y pueden incluir dosis disminuidas en comparación con las dosis empleadas para otros tipos de terapia.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que es típicamente caracterizada por el crecimiento

celular desregulado. Se incluyen en esta definición los cánceres benignos y malignos así como también tumores latentes o las micrometástasis. Los ejemplos de cáncer incluyen aunque sin limitarse a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo 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 de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón o renal, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como también linfoma de células B (incluyendo linfoma no de Hodgkin de grado bajo/ folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de grado elevado; NHL linfoblástico de grado elevado; NHL de células no disociadas pequeñas de grado elevado; NHL de enfermedad de tamaño más grande; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo post- trasplante (PTLD), así como también proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como aquel asociados con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs.

Por "metástasis" se quiere decir el esparcimiento del cáncer de su sitio primario a otros lugares del cuerpo. Las células cancerígenas pueden desprenderse de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente sanguíneo, y crecer en un foco distante (hacer metástasis) en tejidos normales en otra parte del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, contingente en células tumorales que se desprenden del tumor primario, viajando a través del torrente sanguíneo, y deteniéndose en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un suministro de sangre y pueden crecer para formar una masa amenazadora de la vida. Tanto las rutas moleculares estimuladoras como inhibidoras dentro de la célula tumoral regulan este comportamiento, y las

interacciones entre la célula tumoral y las células huéspedes en el sitio distante son también significativas.

Por "sujeto" se quiere significar un mamífero, incluyendo, aunque sin limitarse a, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Pacientes son también sujetos en esta invención.

Para los métodos de la invención, el término "instruir" a un sujeto significa proporcionar indicaciones para la terapia aplicable, medicación, tratamiento, regímenes de tratamiento y similares, por cualquier medio, pero preferentemente por escrito, tal como en la forma de insertos de paquete u otro material promocional escrito.

Para los métodos de la invención, el término "promover" significa ofrecer, publicar, vender o describir un fármaco en particular, combinación de fármacos, o modalidad de tratamiento, por cualquier medio, incluyendo por escrito, tal como en la forma de insertos del paquete. Promover en esta invención se refiere a la promoción de un agente terapéutico, tal como un antagonista de VEGF, por ej., anticuerpo anti-VEGF o agente quimioterapéutico, para una indicación, tal como el tratamiento del cáncer de mama, donde dicha promoción es autorizada por la Administración de Alimentos y Fármacos "Food and Drug Administration" (FDA) como habiéndose demostrado que está asociado con eficacia terapéutica estadísticamente significativa y seguridad aceptable en una población de sujetos.

El término "comercializar" se emplea en esta invención para describir la promoción, venta o distribución de un producto (*por ej.*, fármaco). Comercialización incluye específicamente el envasado, publicidad y cualquier actividad comercial con el propósito de comercializar un producto.

Una "población" de sujetos se refiere a un grupo de sujetos con cáncer, tal como en un ensayo clínico, o según lo observado por oncólogos después de la aprobación por FDA para una indicación en particular, tal como la terapia del cáncer de mama.

El término "terapia anticancerígena" se refiere a una terapia útil para tratar el cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos anticancerígenos incluyen, aunque sin limitarse a, por ej., cirugía, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes empleados en terapia de radiación, agentes anti-angiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, y otros agentes para tratar el cáncer, tales como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento

epidérmico (EGFR) (por ej., un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidor de HER1/EGFR (por ej., erlotinib (Tarceva[®]), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ej., Gleevec[™] (Mesilato de Imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ej., celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ej., anticuerpos neutralizantes, inhibidores de moléculas pequeñas, etc.) que se unen a uno o más de los siguientes objetivos receptor(es) de ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF, VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. Sus combinaciones son también incluidas en la invención.

El término "agente citotóxico" como se emplea en esta invención se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de células. El término tiene el propósito de incluir isótopos radioactivos (por ej. At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fungal, vegetal o animal, incluyendo sus fragmentos y/o variantes.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN[®] ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo su análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enodiina (por ej, caliceamicina, especialmente caliceamicina gamma1l y caliceamicina omega1l (ver, por ej.,

Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como también cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de enodiina cromoproteicos relacionados), aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reaprovisionadores del ácido fólico ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; maytansinoides tales como maytansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2- etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxin; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaciquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ej., TAXOL® paclitaxel (Bristol- Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® libre de Cremophor, formulación en nanopartículas construidas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône- Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; GEMZAR® gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato;

análogos de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecan (Camptosar, CPT-11) (incluyendo el régimen de tratamiento de irinotecan con 5-FU y leucovorina); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluormetilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluyendo el régimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); lapatinib (Tykerb®); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ej., erlotinib (Tarceva®)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los antes mencionados.

También se incluyen en esta definición a los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, lo cual regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, y ARIMIDEX® anastrozol; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido, y goserelina; así como también troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos los cuales inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ej., ribozima ANGIOZYME®) e inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; y las sales, ácidos o derivados de los mismos farmacéuticamente aceptables.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediador intercelular. Los ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citoquinas a las hormonas del

crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona del crecimiento humana de N-metionilo, y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona estimuladora de folículos (FSH), hormona estimuladora de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor alfa y beta de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de mullerian; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-alfa; factor de crecimiento de plaquetas; factor de crecimiento transformador (TGFs) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor I y II de crecimiento del tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma, factores estimuladores de colonias (CSFs) tales como CSF macrófago (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs) 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 tales como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Como se emplea en esta invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia natural.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se emplea en esta invención se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula in vitro y/o in vivo. Por consiguiente, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un lugar que no es la fase S), tales como agentes que inducen la detención G1 y detención en fase M. Los bloqueadores en fase M clásicos incluyen a las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL®, e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se derraman en la detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13.

El término "profármaco" como se emplea en esta solicitud se refiere a una forma de precursor o derivado de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica a células tumorales en comparación con la droga principal y es capaz de ser enzimáticamente activada o convertida en la forma principal más activa. Ver, por ej., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, págs. 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.), páginas 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, aunque sin limitarse a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina los cuales pueden ser convertidos en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden ser derivados en una forma de profármaco para utilizar en esta invención incluyen, aunque sin limitarse a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Por "terapia de radiación" se quiere indicar el uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir daño suficiente a una célula de modo de limitar su capacidad de funcional normalmente o de destruir la célula en su totalidad. Se apreciará que habrá muchas maneras conocidas en la técnica para determinar la dosis y duración del tratamiento. Los tratamientos típicos son proporcionados como una administración de una sola vez y las dosis típicas oscilan entre 10 y 200 unidades (Grays) por día.

Mediante "reducir o inhibir" se quiere decir la capacidad de prevenir/retardar o causar una disminución general preferentemente del 20% o más, más preferentemente del 50% o más, y con máxima preferencia del 75%, 85%, 90%, 95%, o más. Reducir o inhibir puede hacer referencia a los síntomas del trastorno que se está tratando, la presencia o tamaño de metástasis o micrometástasis, el tamaño del tumor primario, la presencia o el tamaño del tumor latente, o el tamaño o cantidad de los vasos sanguíneos en 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 superior a aproximadamente 5 minutos, preferentemente entre aproximadamente 30 y 90

minutos, si bien, de acuerdo con la invención, la infusión intravenosa es alternativamente administradas durante 10 horas o menos.

El término “bolo intravenoso” o “dosis de choque intravenosa” se refiere a la administración del fármaco en una vena de un animal o humano de modo que el cuerpo recibe el fármaco en aproximadamente 15 minutos o menos, preferentemente 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 un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración relativamente lenta y sostenida de un receptáculo del fármaco. El bolsillo puede ser creado mediante pellizco o estirado hacia arriba de la piel y lejos 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 un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración relativamente lenta y sostenida de un receptáculo del fármaco durante un período de tiempo incluyendo, aunque sin limitarse a, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión puede ser realizada mediante implante subcutáneo de una bomba de administración del fármaco implantada debajo de la piel del paciente animal o humano, donde la bomba administra una cantidad predeterminada de fármaco durante un período predeterminado de tiempo, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período de tiempo que abarca la longitud del régimen de tratamiento.

El término “bolo subcutáneo” se refiere a la administración del fármaco debajo de la piel de un paciente animal o humano, donde la administración del fármaco por bolo es preferentemente menos de aproximadamente 15 minutos, más preferentemente menos de 5 minutos, y con máxima preferencia menos de 60 segundos. La administración es preferentemente dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, donde el bolsillo es creado, por ejemplo, por pellizco o estirado de la piel hacia arriba y lejos del tejido subyacente.

Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos incluyendo aquellas afecciones patológicas las cuales predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitativos de trastornos a ser tratados en esta invención incluyen cáncer; tumores benignos y malignos; leucemias y enfermedades linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos

y otros trastornos glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales y de blastocelos; 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 trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir la cantidad de células cancerígenas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferentemente detener) la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o matar células cancerígenas existentes, el mismo puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia contra el cáncer, la eficacia *in vivo* puede, por ejemplo, medirse evaluando la duración de supervivencia, duración de supervivencia libre de progreso (PFS), las tasas de respuesta (RR), duración de respuesta y/o calidad de vida.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas como preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno así como también aquellos que necesitan una prevención del trastorno.

La palabra "etiqueta" cuando se emplea en esta invención se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al polipéptido. La etiqueta puede ser por sí misma detectable (*por ej.*, etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, pueden catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato el cual es detectable.

II. ANTICUERPOS Y ANTAGONISTAS ANTI-VEGF

(i) Antígeno de VEGF

El antígeno de VEGF que se va a utilizar para la producción de anticuerpos puede ser, por ej., la molécula de VEGF₁₆₅ así como también otras isoformas de VEGF o su fragmento que contiene el epítipo deseado. Otras formas de VEGF útiles para generar anticuerpos anti-VEGF de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

El VEGF humano fue obtenido seleccionando, en primer lugar, una genoteca de ADNc preparada a partir de células humanas, utilizando ADNc de

VEGF bovino como una sonda de hibridación. Leung *et al.* (1989) *Science*, 246:1306. Un ADNc identificado de ese modo codifica una proteína de 165 aminoácidos que tiene más del 95% de homología con VEGF bovino; esta proteína de 165 aminoácidos se denomina típicamente VEGF humano (hVEGF) o VEGF₁₆₅. La actividad mitógena de VEGF humano se confirmó expresando el ADNc de VEGF humano en células huéspedes mamíferas. Los medios acondicionados mediante células transfectadas con el ADNc de VEGF humano promovieron la proliferación de células endoteliales capilares, mientras que las células de control no lo hicieron. Leung *et al.* (1989) *Science, supra*.

Si bien se pudo aislar y purificar un factor de crecimiento de células endoteliales vasculares a partir de fuentes naturales para el uso terapéutico subsiguiente, las concentraciones relativamente bajas de la proteína en células foliculares y el alto costo, tanto en términos de esfuerzo como económicos, de la recuperación de VEGF demostraron ser comercialmente desfavorables. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos adicionales para clonar y expresar VEGF por medio de técnicas de ADN recombinante. (Ver, *por ej.*, Ferrara, *Laboratory Investigation* 72:615-618 (1995), y las referencias citadas allí).

VEGF es expresado en una variedad de tejidos como múltiples formas homodiméricas (121, 145, 165, 189, y 206 aminoácidos por monómero) dando como resultado el corte y empalme de ARN alternativo. VEGF₁₂₁ 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 a heparina de VEGF pueden ser disociadas en el término carboxi mediante plasmina para liberar una forma o formas capaces de difusión de VEGF. El secuenciamiento de aminoácidos del péptido de terminal carboxi identificado después de disociación con plasmina es Arg₁₁₀-Ala₁₁₁. La proteína "núcleo" de terminal amino, VEGF (1-110) aislado como un homodímero, une anticuerpos monoclonales neutralizantes (tales como los anticuerpos denominados 4.6.1 y 3.2E3.1.1) y las formas solubles de receptores de VEGF con afinidad similar en comparación con el homodímero intacto de VEGF₁₆₅.

Las diversas moléculas estructuralmente relacionadas con VEGF también han sido identificadas recientemente, incluyendo el factor de crecimiento de placenta (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Ferrara y 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). Una tirosina quinasa receptora, Flt-4 (VEGFR-3), ha sido identificada 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. VEGF-C ha demostrado estar involucrado en la regulación de la angiogénesis linfática. Jeltsch et al. *Science* 276:1423-1425(1997).

(ii) *Anticuerpos Anti-VEGF*

Los anticuerpos Anti-VEGF que son útiles en los métodos de la invención incluyen cualquier anticuerpo, o su fragmento de unión al 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 generalmente 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, aunque sin limitarse a, un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-VEGF monoclonal A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709; un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante 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 "rhuMAb VEGF" o "AVASTIN®". El mismo comprende regiones estructurales de IgG1 humana mutadas y regiones determinantes de complementariedad de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1 que bloquea la unión de VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente 93% de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones estructurales, es derivada de IgG1 humana, y aproximadamente 7% de la secuencia es derivada del anticuerpo murino A4.6.1.

Bevacizumab y otros anticuerpos humanizados anti-VEGF son descritos adicionalmente en la Pat. Estadounidense No. 6.884.879 concedida el 26 de Feb., 2005. Los anticuerpos adicionales incluyen los anticuerpos de serie G6 o B20 (por ej., G6-31, B20-4.1), según lo descrito en la Publicación PCT No. WO2005/012359, Publicación PCT No. WO2005/044853, y Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense US2009-0142343, el contenido de estas solicitudes de patentes se incorpora expresamente en esta invención a modo de referencia. Para anticuerpos adicionales véase las Pat. Estadounidenses Nos. 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020; 6.054.297; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; Publicaciones de Solicitudes de Patentes Estadounidenses Nos. 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317,

20030203409, y 20050112126; y Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004). Otros anticuerpos incluyen aquellos que se unen a un epítipo funcional en VEGF humano que comprenden los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, y C104 o, alternativamente, que comprenden los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

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

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWYF DWWGQGTLVT VSS (SEC ID No. 1)

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

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIFY
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEC ID No. 2).

Un “anticuerpo de serie G6” de acuerdo con esta invención, es un anticuerpo anti-VEGF que es derivado 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 No. WO2005/012359, cuya descripción en su totalidad es expresamente incorporada a la presente a modo de referencia. Véase también la Publicación PCT No. WO2005/044853, cuya descripción entera es expresamente incorporada a la presente a modo de referencia. En una realización, el anticuerpo de 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 serie B20” de acuerdo con esta invención es un anticuerpo anti-VEGF que es derivado 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 No. WO2005/012359, cuya descripción en su totalidad se incorpora expresamente a esta invención como referencia. Ver también la Publicación PCT No. WO2005/044853, y la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense US2009-0142343, el contenido de estas solicitudes de patentes se incorpora en forma expresa a la presente a modo de referencia. En una realización, el anticuerpo de 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 con la unión de un anticuerpo. La mutación de cualquiera de los residuos que contribuyen energéticamente del antígeno (por ejemplo, la mutación de VEGF del tipo salvaje por alanina o mutación homóloga) interrumpirá la unión del anticuerpo de modo que la relación de afinidad relativa ($IC_{50} \text{mutante VEGF} / IC_{50} \text{VEGF tipo salvaje}$) del anticuerpo será superior a 5 (véase el Ejemplo 2 de WO2005/012359). En una realización, la relación de afinidad relativa se determina mediante un ELISA de exhibición de fagos de unión de solución. Brevemente, se recubren inmunoplaacas Maxisorp de 96 receptáculos (NUNC) durante toda la noche a 4°C con una forma de Fab del anticuerpo que se va a analizar a una concentración de 2 ug/ml en PBS, y se bloquea con PBS, 0,5% BSA, y 0,05% Tween 20 (PBT) durante 2h a temperatura ambiente. En primer lugar, se incuban diluciones seriadas de mutantes puntuales de alanina de hVEGF con exhibición de fagos (forma de residuos 8-109) o hVEGF del tipo salvaje (8-109) en PBT sobre las placas revestidas con Fab durante 15 min. a temperatura ambiente, y las placas se lavan con PBS, 0,05% Tween20 (PBST). El fago unido se detecta con un conjugado de peroxidasa de rábano picante de anticuerpo monoclonal anti-M13 (Amersham Pharmacia) diluido 1:5000 en PBT, desarrollado con sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) durante aproximadamente 5 min., templado con H_3PO_4 1.0 M, y se lee espectrofotométricamente a 450 nm. La relación de valores IC_{50} (IC_{50} , ala/ IC_{50} , tipo salvaje) representa la cantidad de veces de reducción en afinidad de unión (la afinidad de unión relativa).

(iii) *moléculas receptoras de VEGF*

Se han identificado dos receptores de VEGF, Flt-1 (también llamado VEGFR-1) y KDR (también llamado 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. La especificidad de cada receptor para cada miembro de la familia de VEGF varía pero VEGF-A se une a Flt-1 y a KDR. Se ha demostrado que neuropilina-1 es un receptor de VEGF selectivo, capaz de unirse a las isoformas de VEGF de unión a heparina (Soker et al. (1998) *Cell* 92:735-45). Tanto Flt-1 como KDR pertenecen a la familia de tirosina quinasas receptoras (RTKs). Las RTKs comprenden una gran familia de receptores de transmembrana con diversas actividades biológicas. En la actualidad, han sido identificadas por lo menos diecinueve (19) subfamilias de

RTK diferentes. La familia de tirosina quinasas receptoras (RTK) incluye receptores que son fundamentales para el crecimiento y la diferenciación de una variedad de tipos celulares (Yarden y Ullrich (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57:433-478; Ullrich y Schlessinger (1990) *Cell* 61:243-254). La función intrínseca de RTKs es activada luego de la unión al ligando, lo cual da como resultado la fosforilación del receptor y múltiples sustratos celulares, y posteriormente en una variedad de respuestas celulares (Ullrich & Schlessinger (1990) *Cell* 61:203-212). Por lo tanto, la transducción de señales mediada por tirosina quinasas receptoras es iniciada por la interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando), típicamente seguido por dimerización del receptor, estimulación de la actividad de tirosina quinasa proteica y transfosforilación de receptor. Los sitios de unión son creados, de ese modo, para moléculas de transducción de señales intracelulares y conducen a la formación de complejos con un espectro de moléculas de señalización citoplásmicas que facilitan la apropiada respuesta celular. (por ej., división celular, diferenciación, efectos metabólicos, cambios en el microambiente extracelular) véase, Schlessinger y Ullrich (1992) *Neuron* 9:1-20. Estructuralmente, tanto Flt-1 como KDR tienen siete dominios del tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular, una región de transmembrana única, y una secuencia de tirosina quinasa consenso la cual es interrumpida por un dominio de inserción en quinasa. Matthews et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9026-9030; Terman et al. (1991) *Oncogene* 6:1677-1683.

Las moléculas receptoras de VEGF, o sus fragmentos, que se unen específicamente a VEGF pueden ser empleadas en los métodos de la invención para unirse a y secuestrar la proteína VEGF, evitando de ese modo su señalización. En ciertas realizaciones, la molécula receptora de VEGF, o su fragmento de unión a 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 de VEGF mediante la unión a VEGF, evitando de ese modo que se una a sus receptores naturales presentes en la superficie de células objetivo. También se incluyen proteínas de fusión al receptor de VEGF, ejemplos de las cuales son descritos más adelante.

Una proteína de receptor de VEGF quimérica es una molécula receptora que tiene secuencias de aminoácidos derivadas de por lo menos dos proteínas diferentes, por lo menos una de las cuales es una proteína receptora de VEGF (por ej., el receptor flt-1 o KDR), que es capaz de unirse a, e inhibir, la actividad biológica de VEGF. En ciertas realizaciones, las proteínas receptoras de VEGF

quiméricas de la invención consisten en secuencias de aminoácidos derivadas de solo dos moléculas receptoras de VEGF diferentes; sin embargo, las secuencias de aminoácidos que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o todos los siete dominios del tipo Ig de la región extracelular de unión al ligando del receptor flt-1 y/o KDR pueden estar ligadas a secuencias de aminoácidos de otras proteínas no relacionadas, por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina. Otras secuencias de aminoácidos a las cuales los dominios del tipo Ig se combinan serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Los ejemplos de proteínas de receptores de VEGF quiméricas incluyen, por ej., Flt-1/Fc soluble, KDR/Fc, o FLt-1/KDR/Fc (también conocido como Trampa VEGF). (Véase por ejemplo la Publicación de Solicitud de PCT No. WO97/44453).

Una proteína de receptor de VEGF soluble o proteínas receptoras de VEGF quiméricas de la invención incluye proteínas receptoras de VEGF las cuales no se fijan a la superficie de células por medio de un dominio de transmembrana. Como tales, las formas solubles del receptor de VEGF, incluyendo las proteínas receptoras quiméricas, si bien son capaces de unión a, e inactivar VEGF, no comprenden un dominio de transmembrana y por ende, en general, no se asocian con la membrana celular de células en las cuales la molécula se expresa.

III. USOS TERAPÉUTICOS DE ANTICUERPOS ANTI-VEGF

La invención abarca la terapia antiangiogénica, una estrategia de tratamiento del cáncer novedosa que apunta a inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos tumorales requeridos para proporcionar nutrientes para soportar el crecimiento tumoral. Debido a que la angiogénesis está involucrada tanto en el crecimiento tumoral primario como en la metástasis, el tratamiento antiangiogénico proporcionado por la invención es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico de tumor en el sitio primario así como también de evitar la metástasis de tumores en los sitios secundarios, por lo tanto, permitiendo el ataque de los tumores por otros agentes terapéuticos.

Específicamente, la invención proporciona un método para tratar a un paciente diagnosticado con cáncer de mama metastásico previamente tratado, que comprende someter al paciente a un régimen de tratamiento que combina una quimioterapia con la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF.

Terapias Combinadas

La invención describe el uso de una combinación de por lo menos un antagonista específico de VEGF con una o más terapias anticancerígenas adicionales. Los ejemplos de terapias anticancerígenas incluyen, sin limitación, cirugía, terapia de radiación (radioterapia), bioterapia, inmunoterapia, quimioterapia o una combinación de estas terapias. Por añadidura, pueden emplearse agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos y antiproliferativos en combinación con el antagonista específico de VEGF.

En ciertos aspectos, la invención provee un método para tratar cáncer de mama previamente tratado, administrando cantidades eficaces de un anticuerpo anti-VEGF y uno o más agentes quimioterapéuticos a un paciente susceptible a, o diagnosticado con, cáncer metastásico previamente tratado. Puede emplearse una variedad de agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Una lista ejemplar y no limitativa de agentes quimioterapéuticos contemplados se proporciona en esta invención bajo el encabezado "Definición", o descrito en esta invención.

En un ejemplo, la invención describe el uso de un antagonista específico de VEGF con uno o más agentes quimioterapéuticos (por ej., un cóctel) o cualquier combinación de los mismos. La administración combinada incluye la administración simultánea, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferentemente hay un período de tiempo mientras que ambos (o la totalidad de) agentes activos ejercen en forma simultánea sus actividades biológicas. La preparación y programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos pueden emplearse de acuerdo con las indicaciones de los fabricantes o según lo determinado empíricamente por el experto en la técnica. La preparación y programas de dosificación para la quimioterapia son también descritos en *Chemotherapy Service Ed.*, M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o puede ser administrado luego de la administración del antagonista específico de VEGF o puede ser administrado simultáneamente con el mismo.

En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia combinada contra tumores con el anticuerpo de la invención incluyen antagonista de otros factores que están involucrados en el crecimiento tumoral, tales como aunque sin limitarse a EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2) ErbB3, ErbB4, o TNF. Algunas veces, puede ser beneficioso también administrar una o más

citoquinas al paciente. En una realización, el anticuerpo de VEGF es administrado en forma conjunta con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede ser administrado en primer lugar, seguido por el anticuerpo de VEGF. Sin embargo, la administración simultánea o administración del anticuerpo de VEGF en primer lugar es también contemplada. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas actualmente empleadas y pueden ser reducidas debido al efecto combinado (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y del anticuerpo anti-VEGF.

La formulación de esta invención también puede contener más de un compuesto activo según lo necesario para la indicación en particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no son afectados adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además anticuerpos los cuales se unen a EGFR, VEGF (por ej. un anticuerpo el cual se une a un epítipo diferente en VEGF), VEGFR, o ErbB2 (por ej., Herceptin®) en la una formulación. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de VEGFR de molécula pequeña. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia combinada para el cáncer con el anticuerpo de la invención incluyen otros agentes antiangiogénicos. Se han identificado muchos agentes antiangiogénicos y son conocidos en la técnica, incluyendo aquellos enlistados por Carmeliet y Jain (2000). En una realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se emplea en combinación con otro antagonista de VEGF o un antagonista del receptor de VEGF tales como variantes de VEGF, fragmentos de receptor de VEGF solubles, aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR neutralizantes, inhibidores de peso molecular bajo de tirosina quinasas de VEGFR y cualquiera de las combinaciones de los mismos. Alternativamente, o por añadidura, pueden administrarse en forma conjunta dos o más anticuerpos anti-VEGF al paciente.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de antagonista específico de VEGF dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, según lo definido anteriormente, la severidad y transcurso de la enfermedad, si el antagonista específico de VEGF es administrado para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la

respuesta al antagonista específico de VEGF, y la discreción del médico interviniente. El antagonista específico de VEGF es adecuadamente administrado al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. En un régimen de terapia combinada, el antagonista específico de VEGF y el uno o más agentes terapéuticos anticancerígenos de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o sinérgica. Como se emplea en esta invención, una cantidad terapéuticamente eficaz es aquella que la administración conjunta de un antagonista específico de VEGF y uno o más otros agentes terapéuticos, o la administración de una composición de la invención, da como resultado la reducción o inhibición del cáncer según lo descrito anteriormente. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es aquella cantidad de un antagonista específico de VEGF y uno o más otros agentes terapéuticos necesarios para reducir o eliminar sinérgica o significativamente afecciones o síntomas asociados con una enfermedad en particular.

El antagonista específico de VEGF y uno o más otros agentes terapéuticos pueden ser administrados en forma simultánea o consecutiva en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o eliminar la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor latente o una micrometástasis. El antagonista específico de VEGF y el uno o más agentes terapéuticos diferentes pueden ser administrados como terapia de mantenimiento para evitar o reducir la probabilidad de recurrencia del tumor.

Como será entendido por aquellos expertos en la técnica, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticancerígenos serán en general alrededor de aquella ya empleadas en terapias clínicas, por ej., donde los agentes quimioterapéuticos son administrados por sí solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. La variación de la dosis se producirá, probablemente, dependiendo de la afección que se está tratando. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Además de los regímenes terapéuticos antes mencionados, el paciente puede ser sometido a terapia de radiación.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo de VEGF administrado es un anticuerpo intacto, desnudo. Sin embargo, el anticuerpo de VEGF puede ser conjugado con un agente citotóxico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo conjugado y/o antígeno al cual está unido es/son internalizado(s) por la célula, dando como resultado una mayor eficacia terapéutica del conjugado en la

matanza de la célula cancerígena a la cual se une. En una realización, el agente citotóxico apunta a, o interfiere con, ácido nucleico en la célula cancerígena. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maytansinoides, caliceamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

La invención describe además un método para instruir a un sujeto humano con cáncer de mama previamente tratado proporcionando instrucciones para recibir tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF de modo de aumentar el tiempo para la supervivencia libre de progreso, para disminuir el riesgo del sujeto de recurrencia del cáncer o aumentar la probabilidad de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende además proporcionar instrucciones para recibir tratamiento con por lo menos un agente quimioterapéutico. El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF puede ser concurrente con, o consecutivo a, el tratamiento con el agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, el sujeto es tratado según lo instruido por el método de instrucción. El tratamiento del cáncer de mama mediante la administración de un anticuerpo anti-VEGF con o sin quimioterapia puede ser continuado hasta la recurrencia del cáncer o la muerte.

La invención proporciona adicionalmente un método promocional, que comprende promover la administración de un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento del cáncer de mama previamente tratado en un sujeto humano. En algunas realizaciones, el método comprende además promover la administración de por lo menos un agente quimioterapéutico. La administración del anticuerpo anti-VEGF puede ser concurrente con la administración del agente quimioterapéutico o puede ser consecutiva a dicha administración. La promoción puede ser llevada a cabo por cualquier medio disponible. En algunas realizaciones, la promoción es por medio de un inserto del paquete que acompaña a una formulación comercial del anticuerpo anti-VEGF. La promoción también puede ser mediante un inserto en el paquete que acompaña a una formulación comercial del agente quimioterapéutico. La promoción puede ser por comunicación escrita u oral a un médico o proveedor de atención médica. En algunas realizaciones, la promoción es mediante un inserto en el paquete donde el inserto en el paquete proporciona instrucciones para recibir terapia de cáncer de mama con anticuerpo anti-VEGF. En una realización adicional, el inserto del paquete incluye algunos o todos los resultados bajo el Ejemplo 1. En algunas realizaciones, la promoción es seguida por el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con o sin el agente quimioterapéutico.

La invención proporciona un método comercial, que comprende comercializar un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento del cáncer de mama previamente tratado en un sujeto humano de modo de aumentar el tiempo del sujeto para la supervivencia libre de progreso, para disminuir la probabilidad del sujeto de recurrencia del cáncer o aumentar la probabilidad del sujeto de supervivencia. En algunas realizaciones, el método comprende además comercializar un agente quimioterapéutico para utilizar en combinación con el anticuerpo anti-VEGF. En algunas realizaciones, la comercialización es seguida por tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con o sin el agente quimioterapéutico.

También se proporciona un método comercial, que comprende comercializar un agente quimioterapéutico en combinación con un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento del cáncer de mama previamente tratado en un sujeto humano de modo de aumentar el tiempo del sujeto de supervivencia libre de progreso, para disminuir la probabilidad del sujeto de recurrencia del cáncer o aumentar la probabilidad del sujeto de supervivencia. En algunas realizaciones, la comercialización es seguida por el tratamiento del sujeto con la combinación del agente quimioterapéutico y el anticuerpo anti-VEGF.

IV DOSIFICACIONES Y DURACIÓN

La composición del antagonista específico de VEGF será formulada, dosificada y administrada en forma consistente con la buena práctica médica. Los factores para tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno en particular que se está tratando, el sujeto en particular que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la planificación de la administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del antagonista específico de VEGF que se va a administrar será dictada por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para evitar, mejorar o tratar, o estabilizar el cáncer; para aumentar el tiempo hasta el progreso (duración de la supervivencia libre de progreso) o para tratar o prevenir la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor latente, o una micrometástasis de cáncer previamente tratado. El antagonista específico de VEGF no necesariamente debe ser, pero es opcionalmente, formulado con uno o más agentes actualmente empleados para evitar o tratar el cáncer o un riesgo de desarrollar un cáncer. La cantidad eficaz de ese tipo de otros agentes depende de la cantidad de antagonista específico de VEGF presente en la formulación, el tipo

de trastorno o tratamiento, y otros factores descritos anteriormente. Estos son generalmente empleados en las mismas dosis y con rutas de administración según se emplean con anterioridad a la presente o aproximadamente entre 1 y 99% de las dosis empleadas hasta la fecha.

Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg (por ej., 0,1-20 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, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ y aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Las dosificaciones particularmente deseables incluyen, por ejemplo, 5 mg/kg , 7,5 mg/kg , 10 mg/kg , y 15 mg/kg . Para administraciones repetidas durante varios días o un tiempo más largo, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que el cáncer es tratado, según lo medido mediante los métodos descritos con anterioridad o conocidos en la técnica. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. En un ejemplo, si el antagonista específico de VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo de la invención es administrado una vez por semana, cada dos semanas, o cada tres semanas, en un rango de dosis entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg , incluyendo aunque sin limitarse a 5 mg/kg , 7,5 mg/kg , 10 mg/kg o 15 mg/kg . El progreso de la terapia de la invención es fácilmente monitoreado mediante técnicas y ensayos convencionales. En otras realizaciones, dicho régimen de dosificación es empleado en combinación con un régimen de quimioterapia como la terapia de segunda línea para tratar el cáncer de mama metastásico previamente tratado. Más información acerca de dosificaciones adecuadas es proporcionada en el Ejemplo que aparece a continuación.

La duración de la terapia continuará durante el tiempo que sea indicado médicamente o hasta que se logra un efecto terapéutico deseado (por ej., aquellos descritos en esta invención).

Los antagonistas específicos de VEGF de la invención son administrados a un sujeto, por ej., un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. La administración local es particularmente deseada, si los extensos efectos colaterales o toxicidad están asociados con el antagonismo de

VEGF. También puede emplearse una estrategia *ex vivo* para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* involucran transfectar o transducir células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un antagonista de VEGF. Luego, las células transfectadas o transducidas son retornadas al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de un amplio rango de tipos incluyendo, sin limitación, células hematopoyéticas (por ej., células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células T o células B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, o células musculares.

Por ejemplo, si el antagonista específico de VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo es administrado por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento inmunosupresivo local, por vía intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Por añadidura, el anticuerpo es adecuadamente administrado por infusión de pulsos, particularmente con dosificaciones en disminución del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación es administrada por inyecciones, con máxima preferencia, inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

En otro ejemplo, el compuesto antagonista específico de VEGF es administrado por vía local, por ej., mediante inyecciones directas, cuando el trastorno o ubicación del tumor lo permite, y las inyecciones pueden ser repetidas en forma periódica. El antagonista específico de VEGF también puede ser administrado por vía sistémica al sujeto o directamente a las células tumorales, por ej., a un tumor o un lecho tumoral luego de la escisión quirúrgica del tumor, a fin de evitar o reducir la recurrencia local o la metástasis, por ejemplo de un tumor latente o micrometástasis.

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

El ácido nucleico puede ser introducido en las células mediante cualquier medio apropiado para el vector empleado. Muchos métodos de ese tipo son bien conocidos en la técnica (Sambrook et al., *supra*, y Watson et al., *Recombinant DNA*, Capítulo 12, 2da edición, Scientific American Books, 1992). Los ejemplos de métodos de administración de genes incluyen métodos de transfección mediada

por liposomas, electroporación, fosfato de calcio /DEAE dextrano, pistola génica y microinyección.

V. FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos empleados de acuerdo con la invención son preparadas para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ta edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen buffers tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 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 incluyendo 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 ej. complejos de Zn-proteínas); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los ejemplos de formulaciones de anticuerpo anti-VEGF liofilizadas son descritas en WO 97/04801, expresamente incorporadas a la presente como referencia.

Opcionalmente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, típicamente, por ej., cloruro sódico, y a menos a aproximadamente concentraciones fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la concentración del conservante oscila entre 0,1 y 2,0%, típicamente v/v. Los conservantes adecuados incluyen aquellos conocidos en las técnicas farmacéuticas. El alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno, y el propilparabeno son ejemplos de conservantes. Opcionalmente, las formulaciones

de la invención pueden incluir un surfactante farmacéuticamente aceptable en una concentración de 0,005 a 0,02%.

En una realización, bevacizumab es suministrado para usos terapéuticos en frascos de un solo uso, libres de conservantes de 100 mg y 400 mg para administrar 4 ml o 16 ml de bevacizumab (25 mg/ml). El producto de 100 mg es formulado en 240 mg de α , α -trehalosa deshidratada, 23,2 mg de fosfato sódico (monobásico, monohidrato), 4,8 mg de fosfato sódico (dibásico, anhidro), 1,6 mg de polisorbato 20, y Agua para Inyección, USP. El producto de 400 mg es formulado en 960 mg de α , α -trehalosa deshidratada, 92,8 mg de fosfato sódico (monobásico, monohidrato), 19,2 mg de fosfato sódico (dibásico, anhidro), 6,4 mg de polisorbato 20, y Agua para Inyección, USP. Véase también la etiqueta de bevacizumab. Bevacizumab está actualmente disponible en el mercado en ciertos países.

La formulación de esta invención también puede contener más de un compuesto activo según lo necesario para la indicación en particular que se está tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no son afectadas adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente anticuerpos los cuales se unen a EGFR, VEGF (por ej., un anticuerpo el cual se une a un epítipo diferente en VEGF), VEGFR, o ErbB2 (por ej., Herceptin®) en una formulación. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de VEGFR (por ej., inhibidor de molécula pequeña, un polipéptido, etc.). Dichas moléculas están presentes, adecuadamente, en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas son descritas en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos conformados, por ej., películas o

microcápsula. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Pat. Estadounidense No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico e y etil-L-glutamato, etileno – acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico – ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico – ácido glicólico y acetato de leuprólido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Si bien polímeros tales como etileno – acetato de vinilo 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 cuerpo durante un largo tiempo, los mismos pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuros, puede lograrse la estabilización modificando residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz poliméricas específicas.

Las formulaciones que se van a emplear para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

VI EFICACIA DEL TRATAMIENTO

La ventaja principal del tratamiento de la invención es la capacidad de producir efectos anticancerígenos marcados en un paciente humano sin causar toxicidades o efectos adversos significativos, de modo que el paciente sea beneficiado del tratamiento en general. La eficacia del tratamiento de la invención puede medirse mediante diversos puntos de referencia comúnmente empleados en la evaluación de los tratamientos para el cáncer, incluyendo aunque sin limitarse a, regresión tumoral, encogimiento del tamaño o peso del tumor, tiempo al progreso, duración de la supervivencia, supervivencia libre de progreso, tasa de respuesta total, duración de respuesta y calidad de vida. Debido a que los agentes antiangiogénicos de la invención apuntan a la vasculatura tumoral y no necesariamente a las células neoplásicas en sí mismas, los mismos representan una clase única de fármacos anticancerígenos, y por ende, pueden requerir

medidas únicas y definiciones de respuestas clínicas a los fármacos. Por ejemplo, el encogimiento del tumor de más del 50% en un análisis bidimensional es el umbral de diagnóstico estándar para declarar una respuesta. Sin embargo, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede causar la inhibición del esparcimiento metastásico sin encogimiento del tumor primario, o puede simplemente ejercer un efecto tumorestático. Por consiguiente, pueden emplearse opcionalmente métodos novedosos para determinar la eficacia de una terapia anti-angiogénica, incluyendo por ejemplo, la medición de marcadores plasmáticos o urinarios de angiogénesis y medición de la respuesta a través de imágenes radiológicas.

En otra realización, la invención provee métodos para aumentar la supervivencia libre de progreso de un paciente humano susceptible a un cáncer previamente tratado o diagnosticado con el mismo. El tiempo hasta el progreso de la enfermedad se define como el tiempo desde la administración del fármaco hasta el progreso de la enfermedad o la muerte. En una realización, el tratamiento combinado de la invención empleando anticuerpo anti-VEGF y uno o más agentes quimioterapéuticos aumenta significativamente la supervivencia libre de progreso en por lo menos aproximadamente 0,5 meses, 1 mes, 2 meses, 2,1 meses, 2,2 meses, 2,8 meses o más. En una realización, el tratamiento combinado de la invención empleando anticuerpo anti-VEGF y uno o más agentes quimioterapéuticos aumenta significativamente la supervivencia libre de progreso en aproximadamente 1 a aproximadamente 5 meses, cuando se compara con un tratamiento con quimioterapia solamente. En una realización, la PFS promedio en meses es de 7,2 en los pacientes tratados con bevacizumab y comparado con 5,1 meses en la terapia sin bevacizumab, con una HR de 0,775, valor p (rango log) 0,0072. En otra realización, la PFS en meses se encuentra en la Figura 3.

En aun otra realización, el tratamiento de la invención aumenta significativamente la tasa de respuesta en un grupo de pacientes humanos susceptibles a un cáncer previamente tratado o diagnosticado con el mismo, quienes son tratados con diversos agentes terapéuticos. La tasa de respuesta es definida como el porcentaje de pacientes tratados quienes respondieron al tratamiento. En un aspecto, el tratamiento combinado de la invención empleando anticuerpo anti-VEGF y uno o más agentes quimioterapéuticos aumenta significativamente la tasa de respuesta en el grupo de pacientes tratados en comparación con el grupo tratado con quimioterapia solamente.

En un aspecto, la invención provee métodos para aumentar la duración de la respuesta en un paciente humano o un grupo de pacientes humanos

susceptibles a un cáncer o diagnosticados con el mismo. La duración de la respuesta se define como el tiempo desde la respuesta inicial hasta el progreso de la enfermedad.

En una realización, la invención puede ser empleada para aumentar la duración de supervivencia de un paciente humano susceptible a un cáncer o diagnosticado con un cáncer.

VII Producción de Anticuerpos

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales son preferentemente cultivados en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede resultar de utilidad conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunógena en la especie que se va a inmunizar, *por ej.*, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja empleando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo, éster de maleimidobenzoyl-sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxysuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales son inmunizados contra el antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados combinando, *por ej.*, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales reciben refuerzos con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde, los animales son sangrados y el suero es analizado para la determinación del título de anticuerpo. Los animales reciben refuerzo hasta la nivelación del título. Preferentemente, el animal recibe refuerzo del conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los conjugados también pueden ser preparados en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Asimismo, se emplean apropiadamente agentes de agregación tales como alumbre para aumentar la respuesta inmunológica.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

Diversos métodos para preparar anticuerpos monoclonales de esta invención se encuentran disponibles en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando el método del hibridoma, en primer lugar, descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o mediante métodos de ADN recombinante (Patente Estadounidense No. 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o mono macaco, es inmunizado según lo descrito en esta invención con anterioridad, para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína empleada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Luego, los linfocitos son fusionados con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de ese modo son sembradas y cultivadas en un medio de cultivo adecuado que contiene, preferentemente, una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), dichas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan la producción a un nivel elevado estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, ejemplos de líneas de células de mieloma son líneas de mieloma murino, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Recolección Americana de Cultivos Tipificados ("American Type Culture Collection"), Rockville, Maryland USA. Las líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón- humano también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma están creciendo se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorbancia vinculado con enzima (ELISA).

Después de que las células de hibridoma son identificadas que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden ser subclonados limitando los procedimientos de dilución y pueden ser cultivados mediante métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Por añadidura, las células de hibridoma pueden ser cultivadas *in vivo* como ascitis tumoral en un animal.

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

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (*por ej.*, empleando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente de ese tipo de ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, los cuales son luego transfectados en células huéspedes tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO, siglas correspondientes a "Chinese hamster ovary"), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos será descrita en forma más detallada más adelante.

En una realización adicional, pueden aislarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de genotecas de fagos de anticuerpo generadas empleando las técnicas descritas en 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, empleando genotecas de fagos. Las publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de elevada afinidad (rango de nM) mediante barajado de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como también infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir genotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, por sustitución de la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente Estadounidense No. 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina.

Típicamente, dichos polipéptidos no inmunoglobulina son sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o son sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

(iii) *Anticuerpos humanizados y humanos*

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de una fuente la cual es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son a menudo denominados residuos de "importación", los cuales son típicamente tomados de un dominio variable de "importado". La humanización puede llevarse a cabo, esencialmente, siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo CDRs de roedor o secuencias de CDR para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente Estadounidense No. 4.816.567) donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos

en los cuales algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos a partir de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto pesados como livianos, a ser empleados en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado "de mejor ajuste" ("best-fit"), la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona contra la genoteca entera de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana la cual es más cercana a la del roedor es luego aceptada como la estructura humana (FR, siglas en inglés de "framework")) 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 estructura en particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. La estructura misma puede ser empleada para diversos anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Adicionalmente, es importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de elevada afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con una realización, los anticuerpos humanizados son preparados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales empleando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Se encuentran disponibles programas de computación los cuales ilustran y exhiben estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del rol probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unir su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse y combinarse residuos de FR a partir de las secuencias de receptor e importadas de modo que se logre la característica deseada de los anticuerpos, tal como mayor afinidad para el o los antígenos objetivo. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente involucrados en influir sobre la unión al antígeno.

Los anticuerpos anti-VEGF humanizados y sus variantes maduras por afinidad son descritos en, por ejemplo, la Pat. Estadounidense No. 6.884.879 concedida el 26 de febrero, 2005.

Actualmente es posible producir animales transgénicos (*por ej.*, ratones) que son capaces, luego de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una completa inhibición de la producción de anticuerpos endógena. La transferencia del arreglo de genes de inmunoglobulina de línea general humano en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos luego del desafío con antígeno. Véase, *por ej.*, 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 tecnología de exhibición de fagos (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpos son clonados en marco en ya sea un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y exhibidos como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula de fagos. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de una sola hebra del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica al anticuerpo que exhibe aquellas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Puede llevarse a cabo la exhibición de fagos en una variedad de formatos; para su revisión véase, *por ej.*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Pueden emplearse diversas fuentes de segmentos de genes V para la exhibición de fagos. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron un arreglo diverso de anticuerpos anti-oxazolona de una genoteca combinatoria al azar pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados puede ser construido y los anticuerpos contra un arreglo diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) pueden ser aislados esencialmente

siguiendo las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véase, además, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

Según lo descrito anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden ser generados mediante células B activadas *in vitro* (véase las Patentes Estadounidenses 5.567.610 y 5.229.275).

Los anticuerpos anti-VEGF monoclonales humanos son descritos en la Patente Estadounidense No. 5.730.977, concedida el 24 de marzo, 1998.

(iv) *fragmentos de anticuerpo*

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos fueron derivados por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, *por ej.*, 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 pueden actualmente ser producidos directamente mediante células huéspedes recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados de las genotecas de fagos de anticuerpo descritas con anterioridad. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden ser directamente recuperados de *E. coli* y químicamente acoplados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro método, los fragmentos de F(ab')₂ pueden ser aislados directamente de cultivo de células huéspedes recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los expertos en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento de Fv de cadena simple (scFv). Véase WO 93/16185.

(vi) *Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos*

La o las modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en esta invención son contempladas. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución se realiza para arribar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios

de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-translacionales del anticuerpo, tal como cambiar la cantidad o posición de sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" ("alanine scanning mutagenesis") según lo descrito por Cunningham y Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, un residuo o grupo de residuos objetivo son identificados (*por ej.*, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y reemplazados por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferentemente alanina o polialanina) para efectuar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones luego son refinadas introduciendo otras variantes o variantes adicionales en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, si bien el sitio para introducir una variación de secuencias de aminoácidos es predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesariamente es predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio determinado, se lleva a cabo barrido de ala o mutagénesis al azar en el codón o región objetivo y las variantes de anticuerpo expresadas son seleccionadas para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de terminal amino y/o carboxilo que oscilan en longitud entre un residuo y polipéptidos que contienen cien residuos o más, así como también inserciones intrasecuencias de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen anticuerpo con un residuo metionilo de terminal N o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al término N o C del anticuerpo a una enzima (*por ej.* para ADEPT) o un polipéptido el cual aumenta la vida media sérica 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 del anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también son contempladas las alteraciones de FR.

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en mantener (a) la estructura del armazón polipeptídico en el área de la sustitución, *por ejemplo*, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la

carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen ("bulk") de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden ser agrupados de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., páginas 73-75, Worth Publishers, Nueva 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 de presentación natural pueden ser divididos en grupos en base a propiedades comunes de cadenas laterales:

(1) hidrófobos: Norleucine, 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 influyen sobre la orientación de cadena: Gly, Pro;

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

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

Cualquier residuo de cisteína no involucrado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo también puede ser sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. A la inversa, puede(n) agregarse enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un ejemplo de una variante sustitucional involucra sustituir uno o más residuos de regiones hipervariables de un anticuerpo parental (por ej., un anticuerpo humanizado o humano). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo parental del cual son generadas. Un modo conveniente para generar dichas variantes sustitucionales involucra maduración de afinidad utilizando exhibición de fagos. Brevemente, diversos sitios de región hipervariable (por ej. 6-7 sitios) son mutados para generar todas las sustituciones amino posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas son exhibidas en forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al

producto génico III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Luego, las variantes exhibidas en fagos son seleccionadas para su actividad biológica (por ej. afinidad de unión) según lo descrito en esta invención. A fin de identificar sitios de regiones hipervariables candidatas para modificación, puede llevarse a cabo mutagénesis de barrido de alanina para identificar residuos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente con la unión al antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno- anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y VEGF humano. Ese tipo de residuos de contacto y residuos lindantes son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en esta invención. Una vez que dichas variantes son generadas, el panel de variantes es sometido a selección según lo descrito en esta invención y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por el término alteración se quiere decir suprimir una o más porciones de carbohidrato encontradas en el anticuerpo, y/o agregando uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos es típicamente N-ligada u O-ligada. N-ligada se refiere a la unión de la porción carbohidrato a la cadena lateral de un residuos de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptidas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación O-ligada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, si bien también puede emplearse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripéptidas antes descritas (para sitios de glicosilación N-ligados). La alteración también puede efectuarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación O-ligados).

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede ser alterado. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo son descritos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No US 2003/0157108 A1, Presta, L. Véase también US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una B-acetilglucosamina (GlcNAc) de bisección en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo son referenciados en WO03/011878, Jean-Mairet *et al.* y en la Patente Estadounidense No. 6.602.684, Umana *et al.* Los anticuerpos con por lo menos un residuos galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo son reportados en WO97/30087, Patel *et al.* Véase, también, WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) con respecto a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc de los mismos.

Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ej., de modo de aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente del antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, pueden introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entrecadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de ese modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o mayor matanza celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral también pueden ser preparados empleando entrecruzadores heterobifuncionales según lo descrito en Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, puede construirse por ingeniería genética un anticuerpo el cual tiene regiones Fc duales y puede de ese modo tener mayor lisis de complemento y mayores capacidades de ADCC. Véase Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función de ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, donde los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en su región Fc. Preferentemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). 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 sustitución(es) las cuales aumentan la unión de C1q y/o CDC.

Los anticuerpos con unión de C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) son descritos en WO99/51642, Patente Estadounidense No. 6.194.551B1, Patente Estadounidense No. 6.242.195B1, Patente Estadounidense No. 6.528.624B1 y Patente Estadounidense No. 6.538.124 (Idusogie *et al.*). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de su región Fc (numeración Eu de residuos).

Para aumentar la vida media sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de salvamento en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) según lo descrito en la Patente Estadounidense 5.739.277, por ejemplo. Como se emplea en esta invención, el término "epítipo de unión al receptor de salvamento" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (*por ej.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la vida media sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

Los anticuerpos con unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), y vidas medias aumentadas, son descritos en WO00/42072 (Presta, L.) y US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma las cuales 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 o 434 (numeración Eu de residuos). En una realización, la variante de anticuerpo que comprende la región Fc con unión a FcRn mejorada comprende las sustituciones de aminoácidos en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de su región Fc (numeración Eu de residuos). En una realización, el anticuerpo tiene 307/434 mutaciones.

Los anticuerpos contruidos por ingeniería genética con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales (preferentemente cuatro) son también contemplados (Solicitud de Pat. Estadounidense No. US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitarse a,

aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de presentación natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de casete de una variante previamente preparada o de una versión no variante del anticuerpo.

(v) *Inmunos conjugados*

La invención también se refiere a inmunos conjugados que comprenden el anticuerpo descrito en esta invención conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fungal, vegetal o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunos conjugados han sido descritos anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos los cuales pueden emplearse incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Se encuentran disponibles una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico son preparados utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetiladipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutarealdehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse según lo descrito en Vitetta *et al. Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminapentaacético rotulado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede ser conjugado a un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en predireccionamiento tumoral donde el conjugado anticuerpo- receptor es administrado al paciente, seguido por remoción de conjugado no unido de la circulación empleando un agente clarificador y luego administración de un "ligando" (por ej. avidina) el cual es conjugado a un agente citotóxico (por ej., un radionucleótido).

(vi) *Inmunoliposomas*

El anticuerpo descrito en esta invención también puede ser formulado como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo son preparados mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); y Pat. Estadounidenses Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación aumentado son descrito en la Patente Estadounidense No. 5.013.556.

Los liposomas particularmente útiles pueden ser generados mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas son extruidos a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la invención pueden ser conjugados a los liposomas según lo descrito en Martin *et al.* *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) por medio de una reacción de intercambio de disulfuros. Un agente quimioterapéutico es opcionalmente contenido dentro del liposoma. Ver Gabizon *et al.* *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989)

VIII. ARTÍCULOS DE MANUFACTURA Y KITS

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de manufactura comprende un contenedor, una etiqueta y un inserto de paquete. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los contenedores pueden ser formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor guarda una composición la cual es eficaz para tratar la afección y puede tener una boca de acceso estéril (por ejemplo el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-VEGF. La etiqueta en, o asociada con, el contenedor indica que la

composición es utilizada para tratar la afección de elección. El artículo de manufactura puede comprender además un segundo contenedor que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros buffers, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. Por añadidura, el artículo de manufactura comprende un inserto de paquete con instrucciones para el uso, incluyendo por ejemplo instrucciones para el usuario de la composición para la administración de la composición del anticuerpo anti-VEGF y un agente quimioterapéutico al paciente con cáncer de mama previamente tratado y opcionalmente HER2 negativo. En ciertas realizaciones, el paciente tiene cáncer metastásico. En algunas realizaciones, el paciente tiene cáncer de mama metastásico previamente tratado y es HER2 negativo. El inserto del paquete puede contener, opcionalmente, algunos o la totalidad de los resultados encontrados en el Ejemplo 1.

El antagonista específico de VEGF puede ser envasado por sí solo o en combinación con otros compuestos terapéuticos anticancerígenos como un kit. El kit puede incluir componentes opcionales que ayudan en la administración de la dosis unitaria a pacientes, tales como frascos para reconstituir formas de polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración IV personalizados, inhaladores, etc. Por añadidura, el kit de dosificación unitaria puede contener instrucciones para la preparación y administración de las composiciones. En ciertas realizaciones, las instrucciones comprenden instrucciones para el uso, incluyendo por ejemplo instruir al usuario de la composición para administrar la composición de anticuerpo anti-VEGF y un agente quimioterapéutico al paciente con cáncer de mama previamente tratado y opcionalmente HER2 negativo. En ciertas realizaciones, el paciente tiene cáncer metastásico. En algunas realizaciones, el paciente tiene cáncer de mama metastásico previamente tratado y es HER2 negativo. Las instrucciones pueden contener, opcionalmente, algunos o todos los resultados encontrados en el Ejemplo 1. El kit puede ser manufacturado como una dosis unitaria de un solo uso para un paciente, múltiples usos para un paciente en particular (a una dosis constante o en donde los compuestos individuales pueden variar en potencia a medida que la terapia progresa); o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para la administración a múltiples pacientes ("envasado a granel"). Los componentes del

kit pueden ser ensamblados en cartones, paquetes de blísteres, botellas, tubos y similares.

Depósito de Materiales

La siguiente línea celular de hibridoma ha sido depositada de acuerdo con las cláusulas del Tratado de Budapest ante la Recolección Americana de Cultivos Tipificados (ATCC, siglas correspondientes a “American Type Culture Collection”), Manassas, VA, USA:

Designación de Anticuerpo	ATCC No.	Fecha de Depósito
A4.6.1	ATCC HB-10709	29 de marzo, 1991

El siguiente ejemplo tiene el propósito de ilustrar, meramente, la práctica de la invención y no es proporcionado a modo de limitación. Las descripciones de todas las bibliografías técnicas de patentes y científicas citadas en esta invención son expresamente incorporadas en su totalidad a modo de referencia.

EJEMPLO

Ejemplo 1. Bevacizumab en Combinación con Regímenes de Quimioterapia en Sujetos con Cáncer de Mama Metastásico Previamente Tratado

El cáncer de mama metastásico (MBC, según sus siglas en inglés) es una enfermedad incurable, sucumbiendo la mayoría de los pacientes a su enfermedad dentro de los 2 años de diagnóstico. Véase, Greenberg, et al., 1996, *J. Clin. Oncol.* 14:2197-205. Aproximadamente 60% de los pacientes con enfermedad en etapa avanzada presentan una recurrencia local y el 40% presentan metástasis distante después de terapia adyuvante. Solo el 10% de los pacientes presentan enfermedad metastásica en el diagnóstico inicial. Véase, Ryberg et al., 2001 *Ann. Oncol.* 12:81-7.

El algoritmo del tratamiento para los pacientes con MBC se basa en diversos factores que incluyen características clínicas, patológicas e histológicas tales como amplificación del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), estado del receptor hormonal, respuesta previa a, y/o falla de, agentes hormonales, cantidad y sitios específicos de enfermedad metastásica, e historia de tratamiento tanto en los entornos metastásicos como adyuvantes. Numerosos agentes quimioterapéuticos citotóxicos han demostrado actividad en MBC, incluyendo antraciclinas, taxanos, gemcitabina, capecitabina, y vinorelbina. Las tasas de respuesta e intervalos libre de progreso observados con estos agentes,

varían, dependiendo del grado y tipo de terapia previa y el grado de enfermedad metastásica. En general, la terapia combinada a base de antraciclina y taxanos (paclitaxel y docetaxel) ha demostrado la mayor actividad en el sitio metastásico, con tasas de respuesta del 40-50% y supervivencia libre de progreso (PFS) promedio de aproximadamente 6-9 meses en pacientes sin exposición previa a agentes en el entorno del adyuvante y sin exposición previa a quimioterapia para el tratamiento de la enfermedad metastásica. Véase, Hamilton y Hortobagyi 2005 *J. Clin. Oncol.* 23:1760-75. Según lo esperado, los pacientes quienes progresan después o durante el primer tratamiento tienen un intervalo libre de progreso más corto (4-6 meses) y supervivencia (8-12 meses). Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar tratamientos adicionales que puedan ser incorporados en regímenes que extenderán tanto el intervalo libre de progreso como la supervivencia de pacientes con enfermedad recurrente.

En el caso del tratamiento de segunda línea para MBC, muchos agentes han demostrado actividad, incluyendo fármacos anti-tubulina (taxanos, vinorelbina) y anti-metabolitos (capecitabina, gemcitabina). En comparación con mitomicina y vinblastina, docetaxel fue el primer agente simple en aumentar significativamente el tiempo hasta el progreso de la enfermedad (4,4 vs. 2,5 meses; $p=0,001$) y la supervivencia (11,4 vs. 8,7 meses; $p=0,0097$) en un estudio grande en Fase III de pacientes con MBC quienes habían recibido terapia previa de antraciclina. Véase, Nabholz et al., 1999 *J. Clin. Oncol.* 17:1413-24. La adición de capecitabina a docetaxel en comparación con el docetaxel por sí solo condujo a mejoras adicionales en el tiempo hasta el progreso (6,1 vs. 4,2 meses; relación de peligro =0,652) y supervivencia (14,5 vs. 11,5 meses; relación de peligro =0,775) en pacientes quienes habían recibido previamente o no eran candidatos para antraciclinas; sin embargo, había un aumento sustancial en la toxicidad con esta combinación. Véase, O'Shaughnessy et al., 2002 *J Clin. Oncol.* 20:2812-23. Estudios adicionales con agentes únicos o combinados no han podido demostrar claras ventajas de supervivencia. Véase, Hamilton y Hortobagyi 2005 *J. Clin. Oncol.* 23:1760-75. En base a la experiencia con múltiples agentes empleados solos o en combinación, el paradigma del tratamiento actual es terapia de único agente consecutiva con la elección de uno o más agentes específicos determinado por una cantidad de factores, incluyendo terapia previa, intervalo libre de tratamiento, perfil de toxicidad, y preferencia del paciente.

A pesar de la disponibilidad de estos múltiples agentes, se necesitan tratamientos adicionales para los pacientes con MBC en entorno de segunda

línea. Nuevos tratamientos dirigidos hacia retardar el progreso de la enfermedad evitando al mismo tiempo la toxicidad sistémica representarían un avance importante en el tratamiento de estos pacientes.

Un estudio en Fase III (RIBBON 2) de Avastin® (bevacizumab) en combinación con quimioterapia aumentó el tiempo de vida de mujeres con cáncer de mama HER2-negativo metastásico cuya quimioterapia inicial había dejado de funcionar sin empeoramiento de la enfermedad (supervivencia libre de progreso o PFS), en comparación con la quimioterapia solamente. Los doctores que tratan a las mujeres en el estudio escogieron el tipo de quimioterapia empleada en combinación con Avastin y las quimioterapias fueron evaluadas en forma conjunta en el análisis primario de criterio de valoración. Los eventos adversos eran consistentes con aquellos previamente reportados para Avastin, y no se observó señal nueva de seguridad de Avastin alguna en el estudio.

Ribbon 2 fue un estudio clínico controlado con placebo, de doble ciego, aleatorizado, multicentral, internacional donde se inscribieron 684 pacientes con cáncer de mama HER2-negativo metastásico quienes habían recibido previamente quimioterapia para su enfermedad metastásica. Véase la Conducción del Estudio en la Tabla 1 y Características de los Pacientes en la Tabla 2. El ensayo evaluó la adición de Avastin® (bevacizumab) o placebo a una elección de los investigadores de quimioterapia. Se emplearon los siguientes regímenes de quimioterapia en el estudio: taxanos: paclitaxel, paclitaxel unido a proteína o docetaxel; gemcitabina; capecitabina; o vinorelbina.

Tabla 1: Conducción del Estudio

Cohorte de Quimio	de	Taxanos	Gemcitabina	Capecitabina	Vinorelbina
Inscriptos, n		304 (44,4)	160 (23,4)	144 (21,1)	76 (11,1)
(%)		201	108	97	53
Bevacizumab (BV)		103	52	47	23
Placebo (PL)					

La elegibilidad en el estudio incluyó lo siguiente:

- Edades Elegibles para Estudio: 18 Años y más
- Sexos Elegibles para Estudio: Ambos
- Acepta Voluntarios Sanos: No

Los criterios de Inclusión en el estudio incluyeron los siguientes:

- Formulario de Consentimiento Informado Firmado

≥18 años de edad

Carcinoma histológicamente confirmado de la mama con enfermedad metastásica medible o no medible que ha progresado (pacientes con una historia de metástasis cerebral son elegibles para participar en el estudio [solamente en los Estados Unidos], siempre y cuando sus metástasis cerebrales hayan sido tratadas y no tengan evidencia alguna de progreso o hemorragia después del tratamiento y ningún requerimiento en marcha de dexametasona)

El progreso de la enfermedad durante o luego de la administración de un régimen de quimioterapia (no investigacional) administrado en el tratamiento de primera línea

Estado de rendimiento de ECOG de 0 o 1

Para las mujeres en edad reproductiva, uso de un medio eficaz anticonceptivo no hormonal

Expectativa de vida ≥3 meses

Voluntad y capacidad de cumplir con el estudio y procedimientos de seguimiento

Los Criterios de Exclusión en el estudio incluyeron los siguientes:

La terapia hormonal previa solamente como tratamiento para la enfermedad metastásica sin quimioterapia. Los pacientes deben haber recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica en el tratamiento de primera línea. La terapia hormonal solamente no es permitida.

Para los sujetos quienes han recibido previamente terapia basada en antraciclina, la documentación de la fracción de eyección ventricular izquierda de < 50% mediante adquisición con múltiples sincronizaciones (MUGA) o ecocardiograma (ECHO).

Tratamiento con más de un régimen citotóxico previo para MBC

Estatus HER2-positivo (los pacientes quienes tienen un estatus de HER2 desconocido, y para quienes la determinación del estatus de HER2 no es posible, son elegibles para este estudio)

Estatus de ER y PR desconocido

Terapia de radiación que no es para paliación, o metástasis cerebral, terapia biológica, o quimioterapia para MBC dentro de los 21 días con anterioridad al Día 0

Terapia previa con bevacizumab u otra terapia direccionada hacia la ruta de VEGF

Metástasis cerebral no tratada

Hipertensión inadecuadamente controlada

Angina inestable

CHF Grado II o superior de la Asociación del Corazón de Nueva York (New York Heart Association)

Historia de infarto de miocardio dentro de 6 meses con anterioridad al Día 0 (el día de la primera infusión con bevacizumab/placebo)

Historia de accidente cerebrovascular o ataque isquémico transitorio dentro de 6 meses con anterioridad al Día 0

Enfermedad vascular periférica clínicamente significativa

Evidencia de diátesis hemorrágica o coagulopatía

Procedimiento quirúrgico mayor, biopsia abierta, o lesión traumática significativa dentro de 28 días antes del Día 0; anticipo de necesidad de procedimiento quirúrgico electivo mayor durante el estudio

Procedimientos quirúrgicos menores, aspiraciones con aguja fina, o biopsias con aguja gruesa dentro de 7 días con anterioridad al Día 0

Historia de fístula abdominal, perforación gastrointestinal, o absceso intra-abdominal dentro de los 6 meses antes del Día 0

Herida seria que no se cura, úlcera o fractura ósea

Historia de reacción anafiláctica a terapia con anticuerpos monoclonales no controlada con premedicación de tratamiento.

Historia de otras enfermedades dentro de 5 años del Día 0, excepto por tumores con un riesgo insignificante de metástasis o muerte, tales como carcinoma de células basales adecuadamente controlado o carcinoma de células escamosas de la piel o carcinoma in situ del cuello uterino

función orgánica inadecuada

Embarazo (test de embarazo en suero positivo) o lactancia

Cualquier otra enfermedad, disfunción metabólica, hallazgo de exámenes físicos, o hallazgo de laboratorio clínico que proporcione una sospecha razonable de una enfermedad o afección que contraindique el uso de un fármaco en investigación o que pueda afectar la interpretación de los resultados o torne al sujeto en alto de riesgo de complicaciones a causa del tratamiento

Bevacizumab (5mg/kg semanalmente equivalente)

15 mg/kg IV cada 3 semanas; o

10 mg/kg IV cada 2 semanas

Más

Quimioterapia

Taxano

Paclitaxel (por ej, Taxol®): 90 mg/m² IV cada semana durante 3 semanas seguido por 1 semana de descanso; o

Paclitaxel (por ej., Taxol®): 175 mg/m² IV cada 3 semanas; o

Paclitaxel partículas unidas a proteínas (Abraxane®): 260 mg/m² IV cada 3 semanas; o

Docetaxel (Taxotere®): 75-100 mg/m² IV cada 3 semanas; o

Gemcitabina (Gemzar®): 1250 mg/m² IV en los Días 1 y 8 de cada ciclo de 3 semanas; o

Vinorelbina (Navelbine®): 30 mg/m² IV cada semana; o

Capecitabina (Xeloda®): 1000mg/m² oralmente dos veces al día en los Días 1-14 de cada ciclo de 3 semanas

En el estudio, PFS fue definida como el tiempo desde la aleatorización hasta el progreso de la enfermedad o la muerte según lo evaluado por los médicos intervinientes en el estudio (evaluado por el investigador). Los puntos de referencia secundarios incluyeron la tasa de respuesta objetiva, la duración de la respuesta, la tasa de supervivencia de un año, la supervivencia general, la evaluación de la PFS por tipo y seguridad de la quimioterapia. Los resultados indicaron una prolongación en la PFS, el criterio de valoración primario es una cohorte agrupada de pacientes que reciben avastin + quimioterapia (HR = 0,775; valor p (rango log) = 0,0072). La PFS promedio (95% CI) fue de 7,2 meses (6,5, 7,6) en el brazo de bevacizumab/quimioterapia (Brazo A de la **Figura 1**, n=459) contra 5,1 meses (4,1, 6,0) en el brazo de placebo/quimioterapia (Brazo B de la **Figura 1** n=225). Ver la Tabla 3 Análisis Primario de Eficacia de PFS y **Figura 2** (Criterio de valoración Primario de PFS) y **Figura 3** (Análisis Específicos de Cohortes de PFS). Los resultados de PFS fueron generalmente consistentes a través de las cohortes de quimioterapia con la excepción del pequeño subgrupo de vinorelbina. Otros subgrupos (edad, negativo triple, etc.) fueron en general consistentes con los resultados primarios de PFS. La mejora observada en la PFS general fue respaldada por el criterio de valoración de eficacia secundario de ORR. Ver la **Figura 4**. Ver la Tabla 4 para Análisis Interino de Eficacia de OS. No se observaron en el estudio señales de seguridad de bevacizumab nuevas. Ver, por ej., la Tabla 5, Resumen de Seguridad, Población de Seguridad, Tabla 6 AEs Seleccionados, Población de Seguridad y la Tabla 7 Resumen de Seguridad mediante Cohorte de Quimioterapia, Población de Seguridad. Bevacizumab fue beneficioso para pacientes como un tratamiento de segunda línea.

Tabla 2 Características de los pacientes, Población ITT

	Quimio/PL (n=225)	Quimio/BV (n=459)
Edad, años		
Media	55,0	55,0
Media (rango)	55 (23–90)	55,6 (25–86)
≥65, %	19,6	22,0
ECOG PS 1, %	50,9	50,2
Nº de sitios metastásicos		
Media (rango)	2,5 (0–6)	2,5 (0–6)
≥ 3 sitios, %	47,1	44,5
Enfermedad solamente ósea, %	9,8	6,8
Enfermedad visceral, %	25,3	26,8
HR positivo, %	73,3	71,7
Triple negativo, %	20,9	24,4
Intervalo desde diagnóstico de MBC hasta primer PE ≥6 meses, %	70,7	72,5
HER2-negativo, %	85,3	83,9
-desconocido, %	13,8	14,6
Enfermedad medible, %	79,6	78,9

BV=bevacizumab, HR=receptor hormonal, PE=progreso de la enfermedad, PL=placebo.

Tabla 3 Análisis de Eficacia Primario de PFS, Población ITT

	Quimio/PL (n=225)	Quimio/BV (n=459)
Nº de eventos, n (%)	184 (81,8)	372 (81,0)
Evento contribuyente más temprano, n (%)		
Enfermedad progresiva	170 (75,6)	341 (74,3)
Muerte	14 (6,2)	31 (6,8)
PFS (meses)		
Media (95% CI)	5,1 (4,1–6,0)	7,2 (6,5–7,6)
Análisis Estratificado HR (95% CI)	0,78 (0,64–0,93)	
valor p (rango log)	0,0072	

Tabla 4 Análisis Interino de Eficacia de OS*, Población ITT

	Quimio/PL (n=225)	Quimio/BV (n=459)
Nº de muertes, n (%)	109 (48,4)	206 (44,9)
OS (meses)		
Media (95% CI)	16,4 (14,6–20,2)	18,0 (17,1–20,2)
Análisis estratificado HR (95% CI)	0,90 (0,71–1,14)	

valor p (rango log)	0,3741	
tasa de supervivencia de 1 año (%)	66,2	69,5

*Este es el análisis interino a 57% de información (315 eventos).

Tabla 5 Resumen de Seguridad, Población de Seguridad

n (%)	Quimio/PL (n=221)	Quimio/BV (n=458)
EAs* Seleccionados (≥Grado 3)	50 (22,6)	163 (35,6)
EAS	39 (17,6)	112 (24,5)
EA que conduce a discontinuidad /muerte	16 (7,2)	61 (13,3)
EA que conduce a la muerte	5 (2,3)	6 (1,3)

EA=evento adverso, BV=bevacizumab, PL=placebo, EAS=Evento adverso serio.

* EAs previamente mostrado como asociados con BV

Tabla 6 EAs Seleccionados (≥ Grado 3), Población de Seguridad

n (%)	Quimio/PL (n=221)	Quimio/BV (n=458)
Neutropenia	32 (14,5)	81 (17,7)
Hipertensión	1 (0,5)	41 (9,0)
Neuropatía Sensorial	13 (5,9)	30 (6,6)
Proteinuria	1 (0,5)	15 (3,3)
Neutropenia febril	6 (2,7)	10 (2,2)
Eventos de sangrado	0 (0)	8 (1,7)
Disfunción sistólica del ventrículo izquierdo	0 (0)	4 (0,9)
ETA	3 (1,4)	3 (0,7)
Perforación GI	0 (0)	3 (0,7)
Dehiscencia de una herida	0 (0)	3 (0,7)
RPLS	0 (0)	0 (0)

ETA=evento trombótico arterial, GI=gastrointestinal, RPLS=síndrome de leucoencefalopatía posterior reversible.

Tabla 7 Resumen de Seguridad por Cohorte de Quimioterapia, Población de Seguridad

n (%)	Tax/PL (n=101)	Tax/BV (n=200)	Gem/PL (n=52)	Gem/BV (n=108)
EA Seleccionado (Grado ≥3)	29 (28,7)	79 (39,5)	5 (9,6)	34 (31,5)
EAS	12 (11,9)	53 (26,5)	8 (15,4)	25 (23,1)
EA que conduce a discontinuidad de BV/PL o muerte	4 (4,0)	12 (6,0)	4 (7,7)	6 (5,6)
EA que conduce a la muerte	0 (0)	3 (1,5)	2 (3,8)	2 (1,9)
n (%)	Cape/PL (n=46)	Cape/BV (n=97)	Vin/PL (n=22)	Vin/BV (n=53)
EA seleccionado (Grado ≥3)	2 (4,3)	20 (20,6)	14 (63,6)	30 (56,6)
EAS	12 (26,1)	18 (18,6)	7 (31,8)	16 (30,2)
EA que conduce a la discontinuidad de BV/PL o muerte	4 (8,7)	6 (6,2)	1 (4,5)	4 (7,5)
EA que conduce a la muerte	2 (4,3)	1 (1,0)	1 (4,5)	0 (0)

EA=evento adverso, EAS=evento adverso serio, Tax=taxano, Gem=gemcitabina, Cape=capecitabina, Vin=vinorelbina.

Listado de Secuencias

- <110> Genentech, et al.
- <120> Terapia Antiangiogénesis para el Tratamiento del Cáncer de Mama
Previamente Tratado
- <130> P4349R1 WO
- <141> 13-08-2010
- <150> US 61/266.343
- <151> 03-12-2009
- <150> US 61/234.281
- <151> 15-08-2009
- <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

15
- Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

30
- Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

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 para tratar a un paciente diagnosticado con cáncer de mama previamente tratado metastásico, que comprende someter al paciente a un régimen de tratamiento que combina una quimioterapia con la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF, donde la quimioterapia del régimen de tratamiento comprende la administración de por lo menos un agente quimioterapéutico, y donde el régimen de tratamiento extiende eficazmente la supervivencia libre de progreso del paciente.

2 El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo anti-VEGF se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-VEGF monoclonal A4.6.1 producido mediante hibridoma ATCC HB 10709.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo humanizado.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo A4.6.1 humanizado o un fragmento del mismo.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la supervivencia libre de progreso del paciente se extiende por lo menos aproximadamente 2,1 meses o más cuando se compara con otro paciente tratado con la quimioterapia solamente.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el cual el anticuerpo anti-VEGF tiene una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWFY DWVGQGTLVT VSS (SEC ID NO.1)

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

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIFY
TSSLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEC ID NO.2).

8. Un kit para tratar un cáncer de mama metastásico previamente tratado en un paciente humano que comprende un paquete que comprende una composición de anticuerpo anti-VEGF e instrucciones para utilizar la composición de anticuerpo anti-VEGF en combinación con quimioterapia, donde las instrucciones indican que la supervivencia libre de progreso para pacientes que reciben quimioterapia y bevacizumab es de 7,2 meses con una relación de peligro de 0,775 y un valor p de 0,0072.

9. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8, donde el anticuerpo anti-VEGF tiene una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWFY DWWGQGTLVT VSS (SEC ID NO. 1)

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

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIFY
TSSLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEC ID NO. 2).

10. El kit de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

11. Un método para instruir a un sujeto humano con cáncer, comprendiendo el método proporcionar instrucciones para recibir tratamiento para el cáncer de mama para el cáncer de mama metastásico previamente tratado con

un anticuerpo anti-VEGF de modo de aumentar la supervivencia libre de progreso del paciente.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual las instrucciones comprenden además proporcionar instrucciones para recibir tratamiento con por lo menos un agente quimioterapéutico.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF es concurrente con el tratamiento con el agente quimioterapéutico.

14. Un método promocional, que comprende promover la administración de un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento del cáncer de mama en un sujeto humano con cáncer de mama metastásico previamente tratado de modo de aumentar la supervivencia libre de progreso del paciente.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual el método comprende además promover la administración de por lo menos un agente quimioterapéutico.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual la administración del anticuerpo anti-VEGF es concurrente con la administración del agente quimioterapéutico.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual la promoción es mediante un inserto del paquete, donde el inserto del paquete proporciona instrucciones para recibir el tratamiento contra el cáncer con un anticuerpo anti-VEGF.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 14 en el cual la promoción es mediante un inserto del paquete que acompaña una formulación comercial del anticuerpo anti-VEGF.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual la promoción es mediante un inserto del paquete que acompaña una formulación comercial del agente quimioterapéutico.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual la promoción es mediante comunicación por escrito a un médico o proveedor de atención médica.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual la promoción es mediante comunicación oral a un médico o proveedor de atención médica.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual la promoción es seguida por el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual la promoción es seguida por el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF y el agente quimioterapéutico.

24. Un método comercial, que comprende comercializar un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento del cáncer de mama en un sujeto humano con cáncer de mama metastásico previamente tratado de modo de aumentar la supervivencia libre de progreso del paciente.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, donde el método comprende además comercializar un agente quimioterapéutico para utilizar en combinación con el anticuerpo anti-VEGF.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el cual la comercialización es seguida por tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el cual la comercialización es seguida por tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF y el agente quimioterapéutico.

28. Un método comercial, que comprende comercializar un agente quimioterapéutico en combinación con un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento del cáncer de mama en un sujeto humano con cáncer de mama

metastásico previamente tratado de modo de aumentar la supervivencia libre de progreso del paciente.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en el cual la comercialización es seguida por tratamiento del sujeto con la combinación del agente quimioterapéutico y el anticuerpo anti-VEGF.

RESUMEN

Esta invención se refiere, en general, al tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas con anticuerpos anti-VEGF. Más específicamente, la invención se refiere al tratamiento de pacientes humanos susceptibles a, o diagnosticados con, cáncer utilizando un anticuerpo anti-VEGF, en combinación con uno o más agentes terapéuticos antitumorales, en cáncer de mama metastásico previamente tratado.

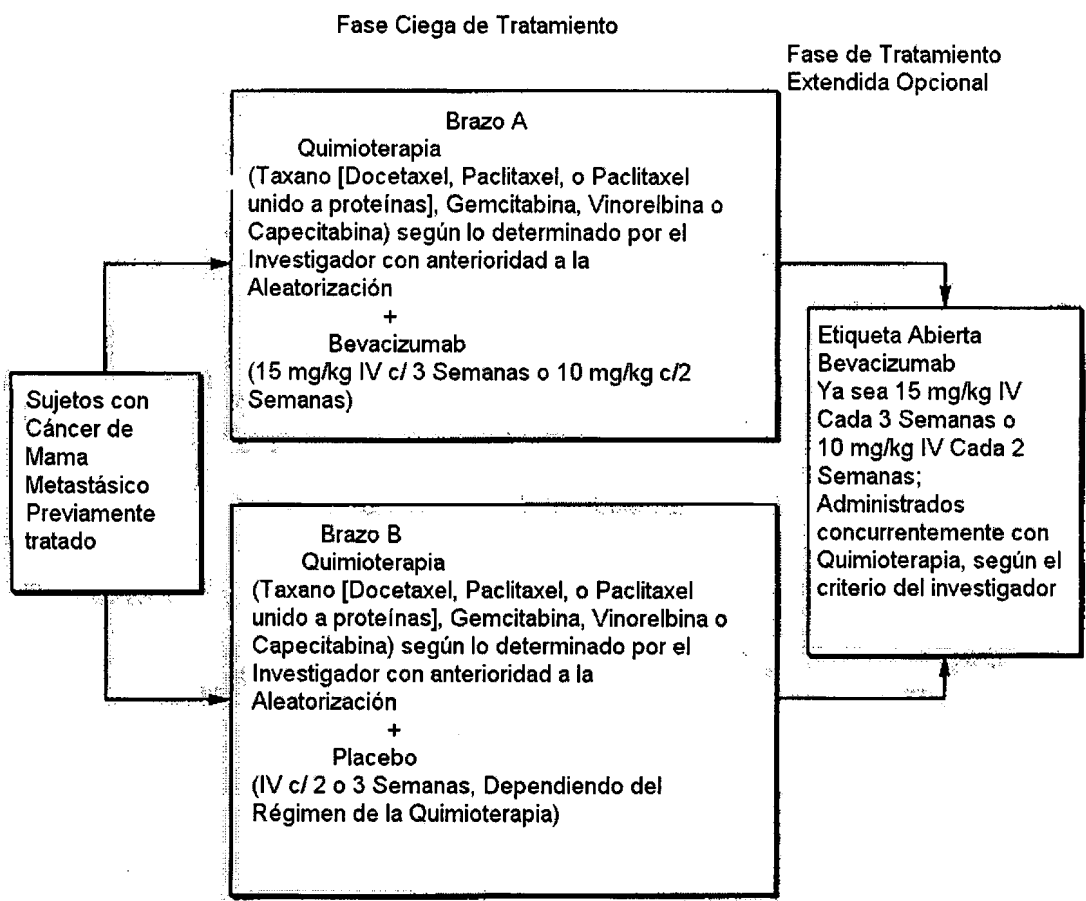
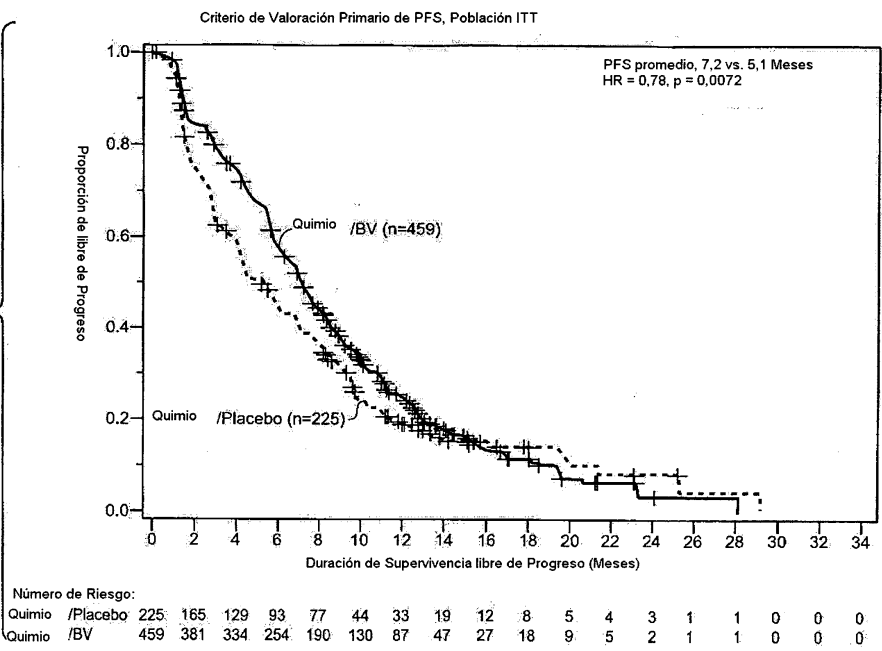


FIG. 1

FIG. 2



		Quimio +PL n=225		Quimio +BV n=459		
Cohorte	Total (n)	Eventos	Promedio (meses)	Eventos	Promedio (meses)	HR (95% CI)
Todos los sujetos	684	184/225	5.1	372/459	7.2	0.77 (0.64-0.93)
Quimio						
Taxanos	304	84/103	5.8	151/201	8.0	0.64 (0.49-0.84)
Gemcitabina	160	43/52	5.5	84/108	6.0	0.90 (0.61-1.32)
Capecitabina	144	39/47	4.1	87/97	6.9	0.73 (0.49-1.08)
Vinorelbina	76	18/23	7.0	50/53	5.7	1.42 (0.78-2.59)

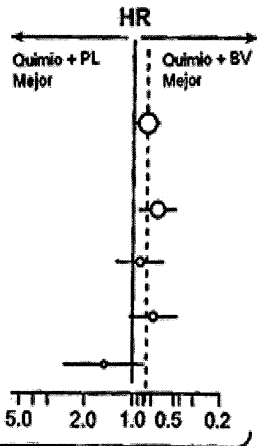


FIG. 3

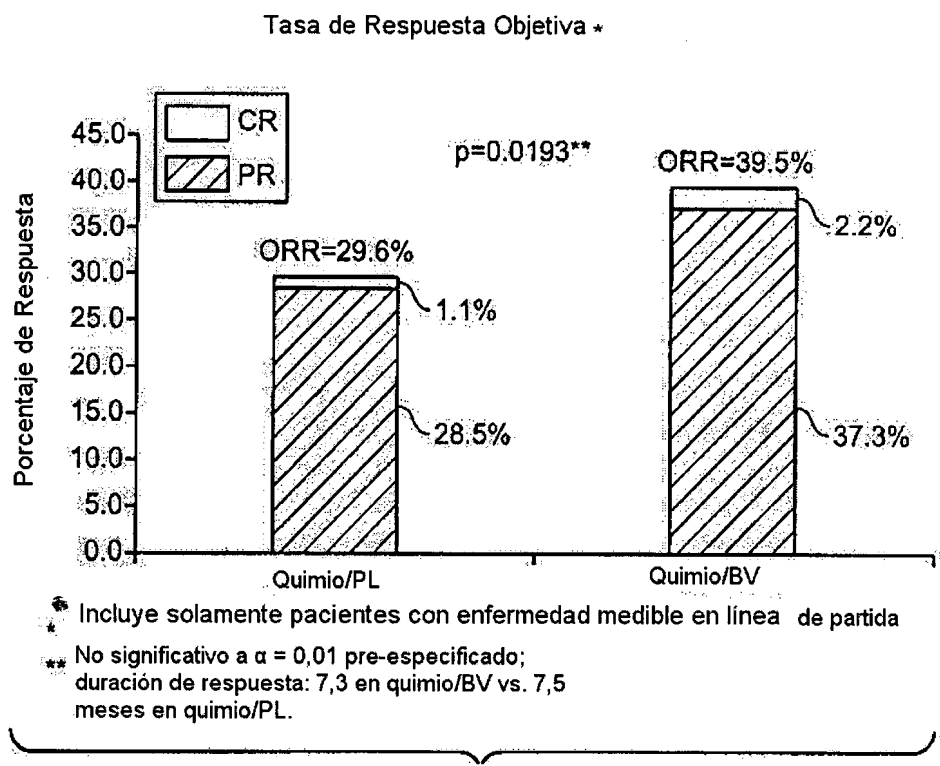


FIG. 4

JP

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciliado(s) en

South San Francisco, California 94080-4990
USA

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

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

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley, renunciar o 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.

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

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera No. 16-58 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-58, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en:

South San Francisco, California

Granted and signed in USA

hoy de de 20

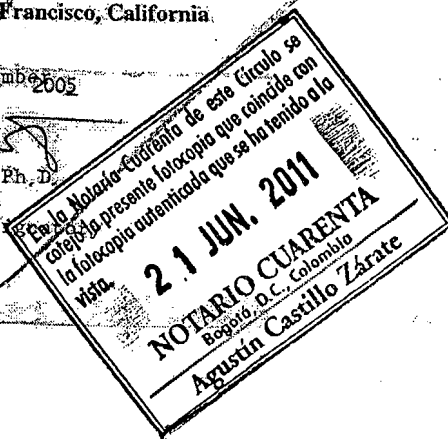
this 6th day of December 2005

Firma

Signature

Nombre
Cargo

Name: **Ellen R. Schwartz, Ph.D.**
Title: **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.

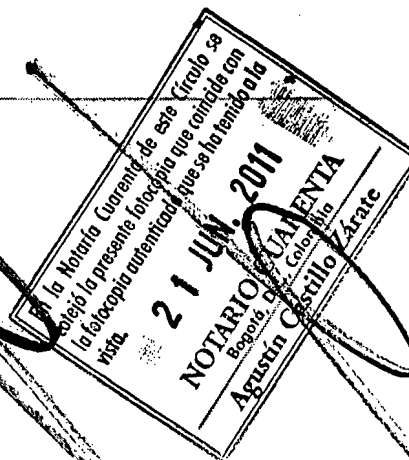
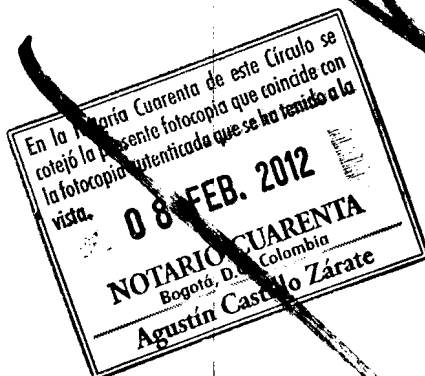
August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



AP 774-08

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

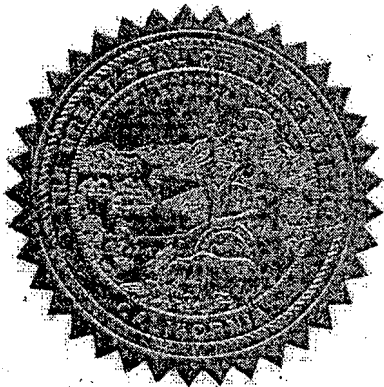
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

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

10. Signature



[Signature]

Secretary of State

VP241A (REV. 4/05)

OSP 05 90772



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 before me, Aida Mielat Guam

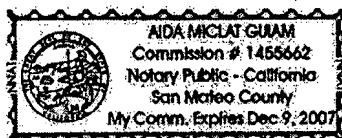
personally appeared Timothy R. Schwartz

Name and Title of Officer (e.g., "Jane 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 Mielat Guam
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: _____

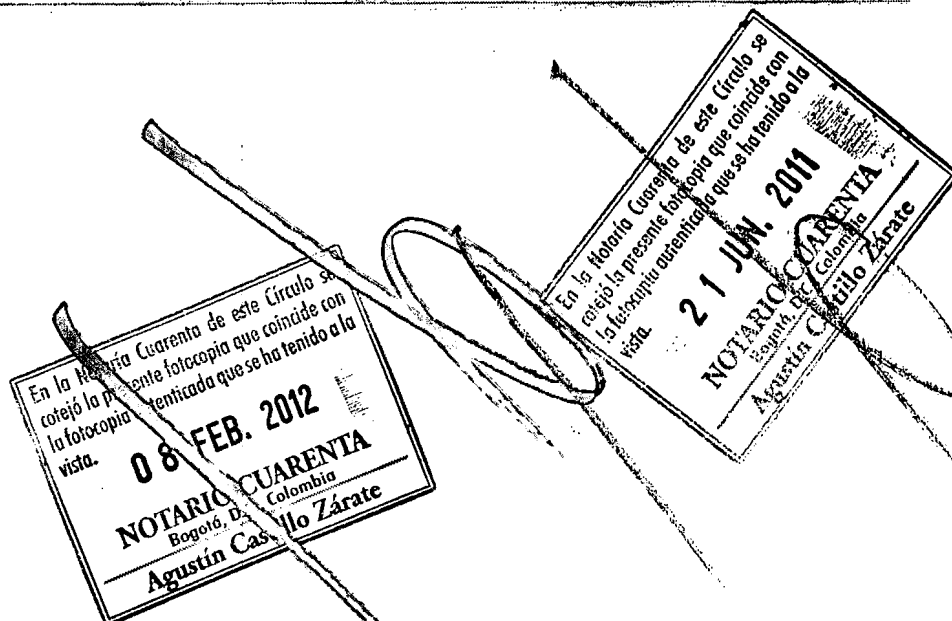
Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

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

Signer Is Representing: _____

**RIGHT THUMBPRINT
 OF SIGNER**
 Top of thumb here.



93 33

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

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

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

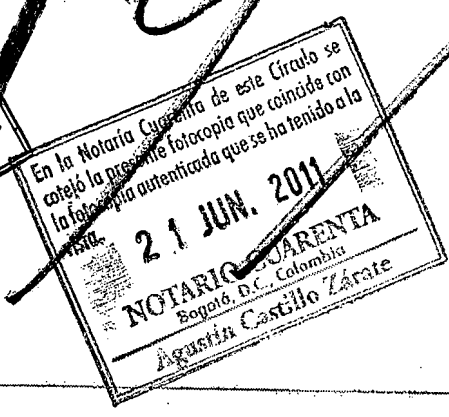
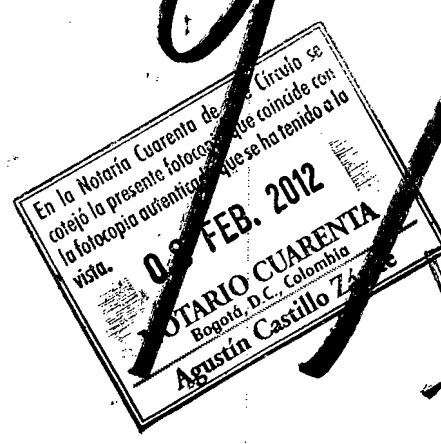
1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

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

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

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

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

☐ a quien conozco personalmente

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

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISION # 1456612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y pueda
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: _____

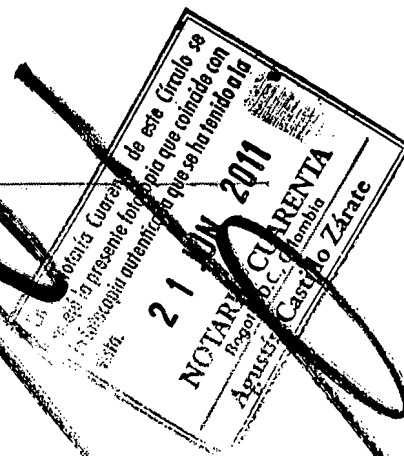
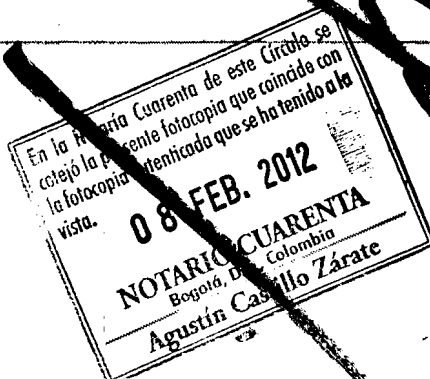
Capacidad(es) Relvindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

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

El firmante representa: _____

Huella Indica derecho del firmante: Parte alta del dedo aquí
--



AUTORIZACION

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

27 de Agosto de 2002

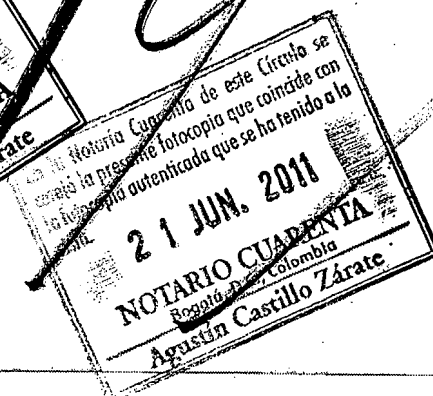
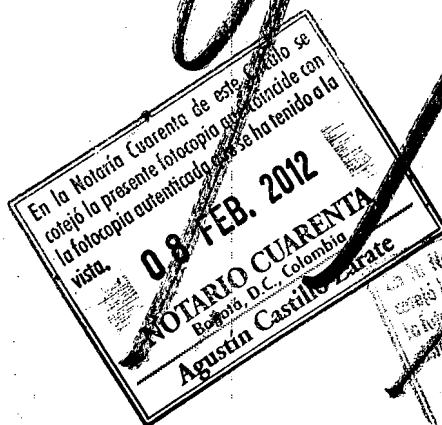
Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual

Genentech, Inc.



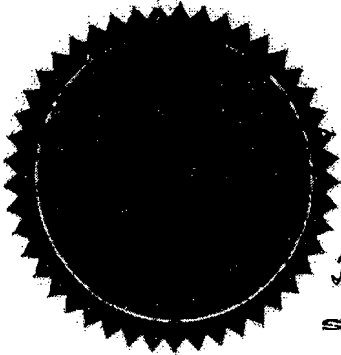
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

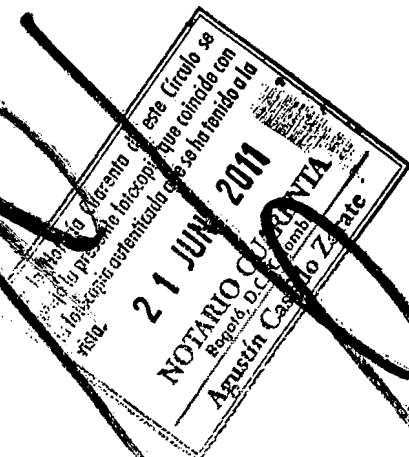
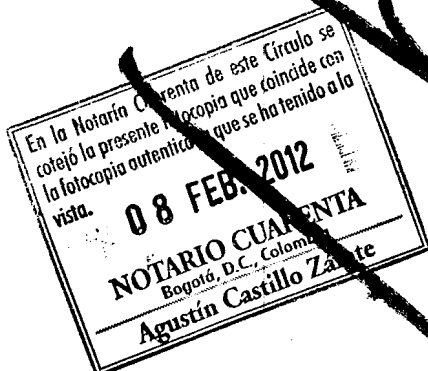
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

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



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

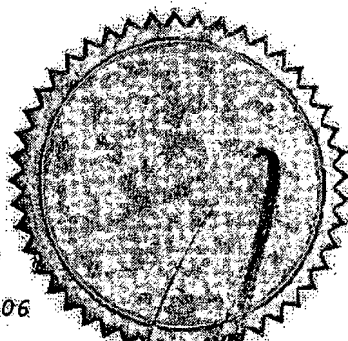
PAGE 1

The First State

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

2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION 3900384

DATE: 05-24-05

En la Notaria Cuarenta de este Circolo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
08 FEB. 2012
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaria 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

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.

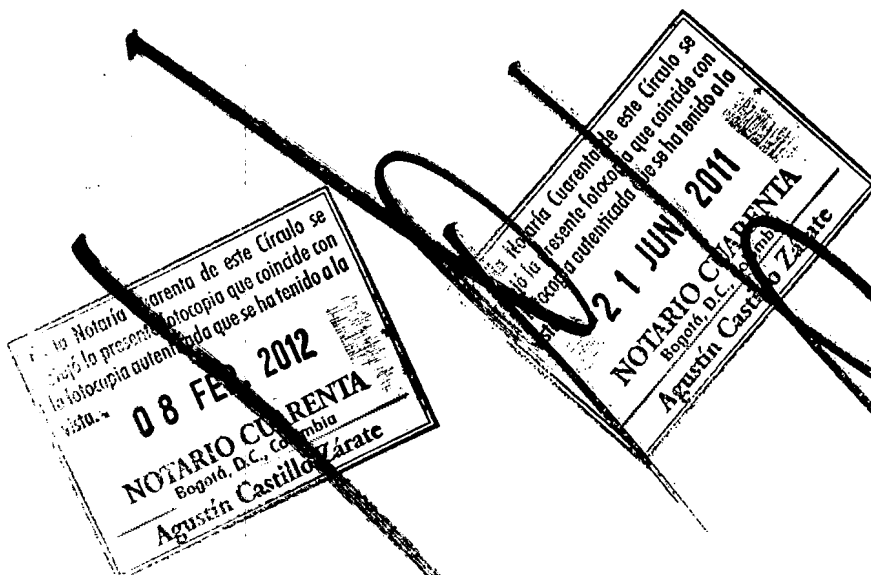
ARTICLE 2

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

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
08 FEB. 2012
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Círculo 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

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;

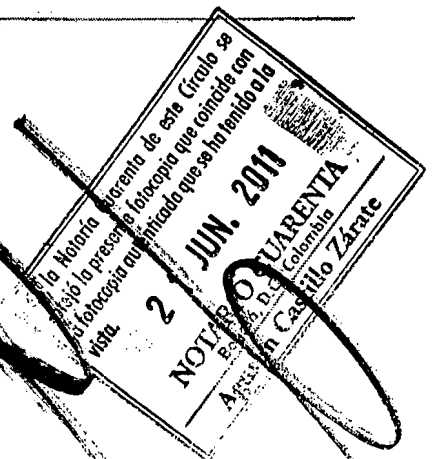
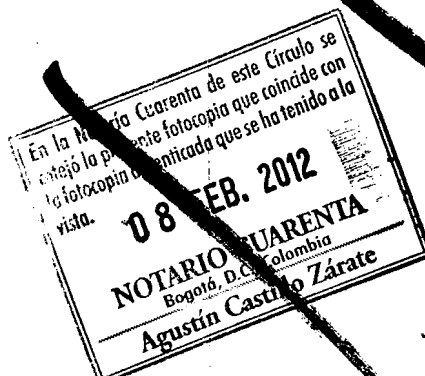
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(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.

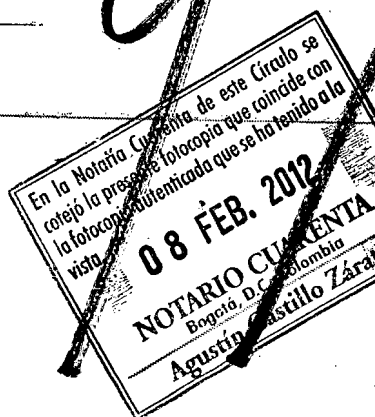
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(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.

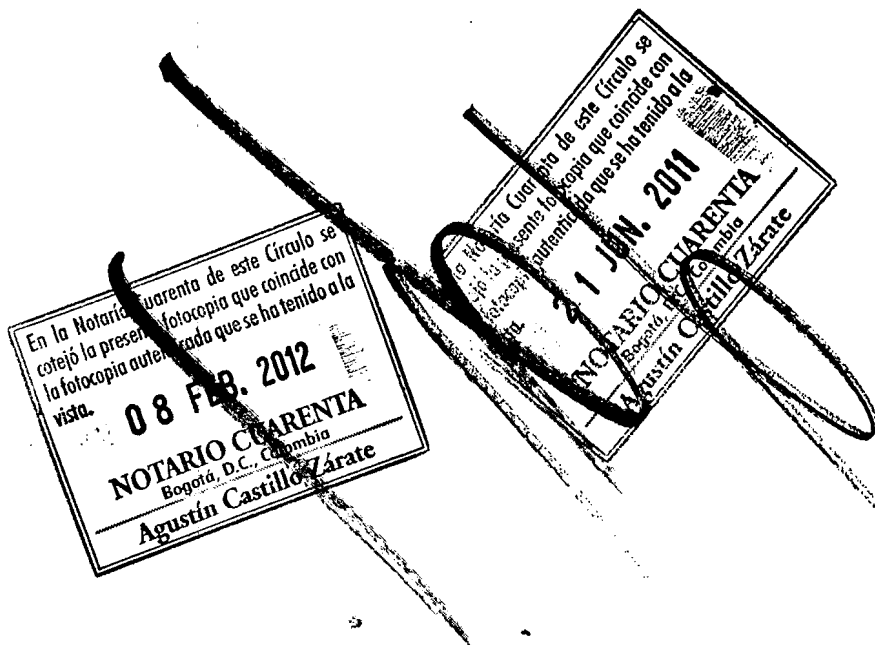
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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

En la Notaría Cuarenta y uno de este Cirulo se
cotejo la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
08 FEB. 2012
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta y uno de este Cirulo se
cotejo 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

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

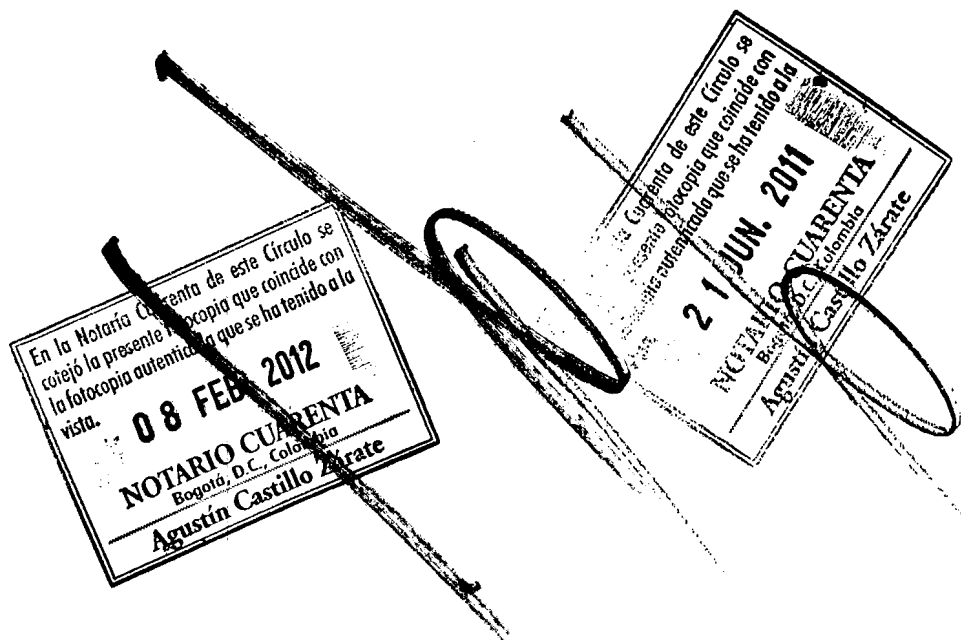
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(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.

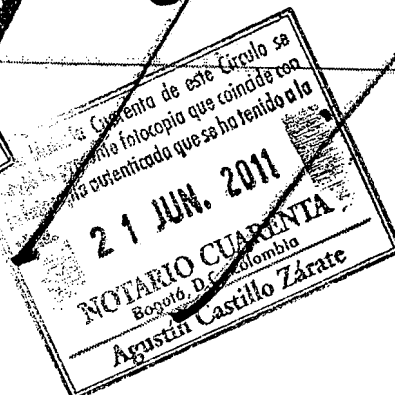
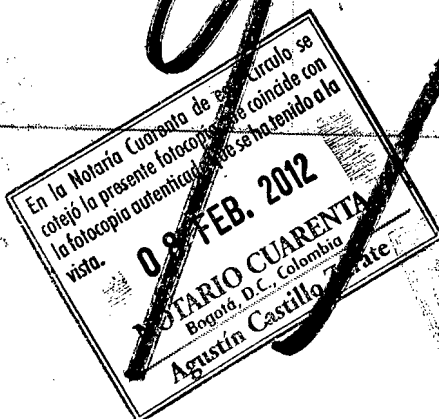
SECTION 8.05. Definitions. For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or 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



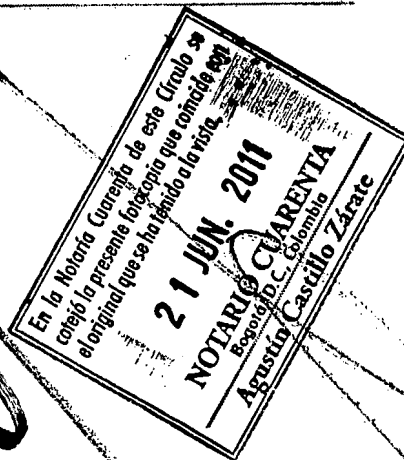
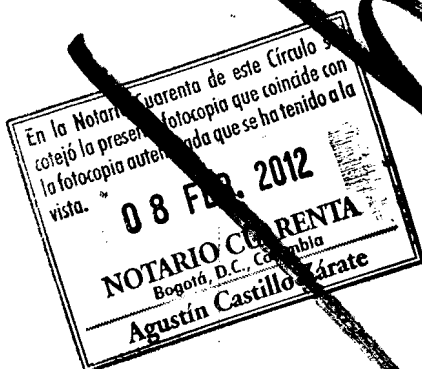
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment,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

En la Notaría Cuarenta de este Circolo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autografada que se ha tenido a la
vista.
08 FEB. 2012
NOTARIO CUARENTA
Bogotá D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

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

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.

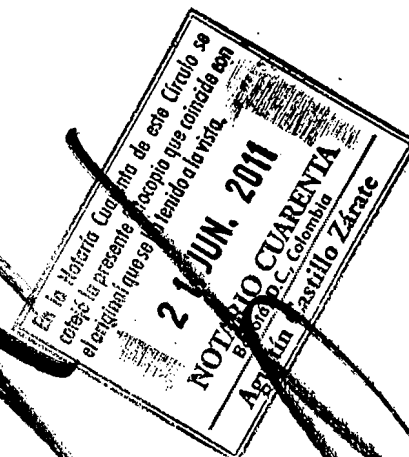
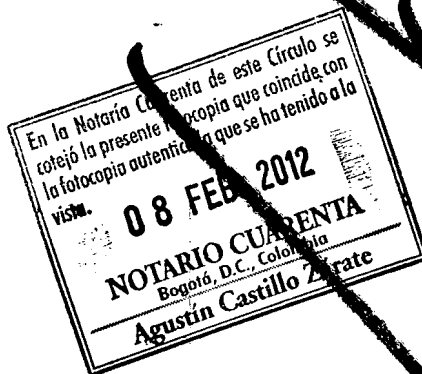
GENENTECH, INC.

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

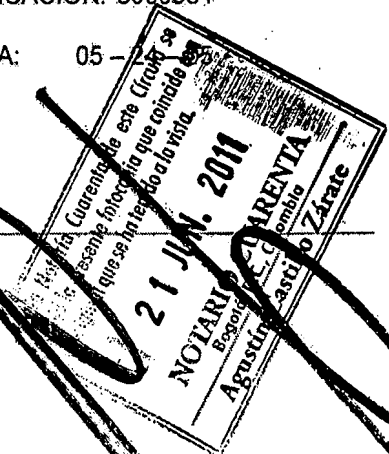
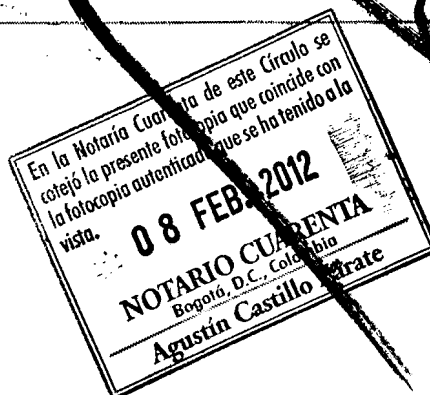


DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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 -



107

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

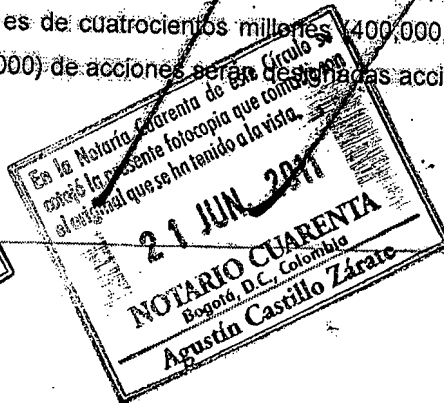
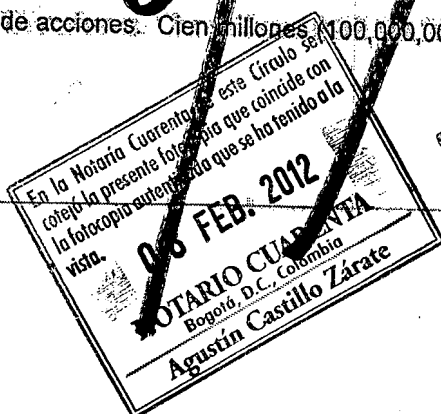
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

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.

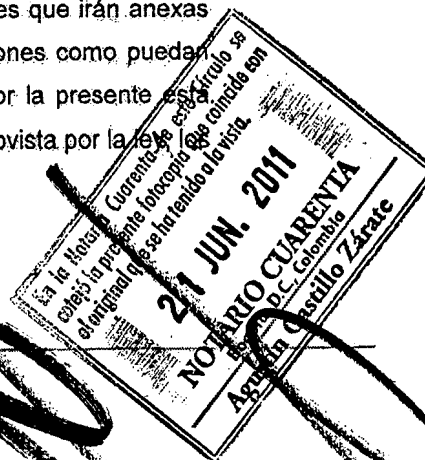
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de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



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

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, número que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o 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;

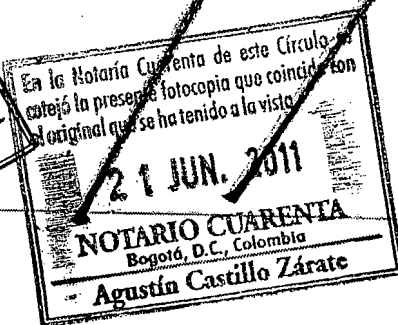
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(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 cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y



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

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

ARTICULO 5

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

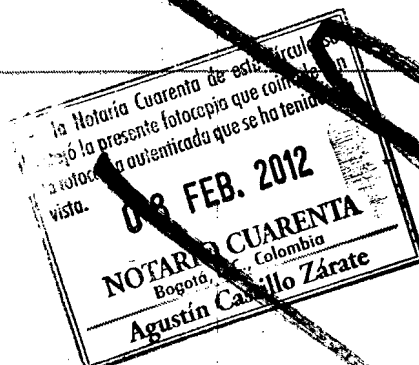
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

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

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

ARTICULO 6

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

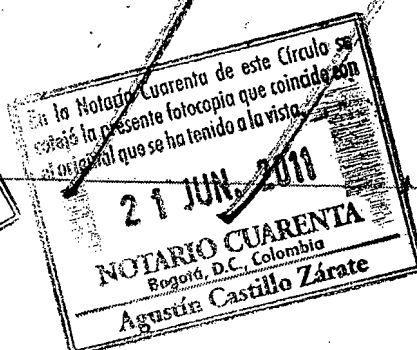


acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i)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

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por 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 compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo



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

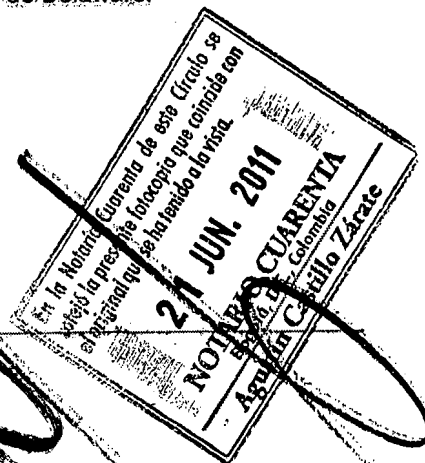
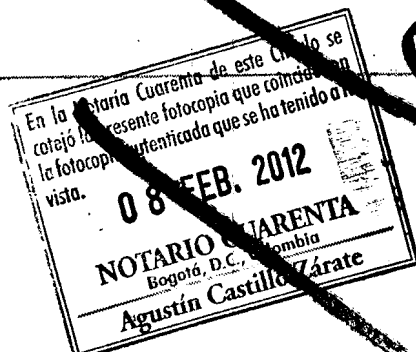
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, 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 una subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículo 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con esto.

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

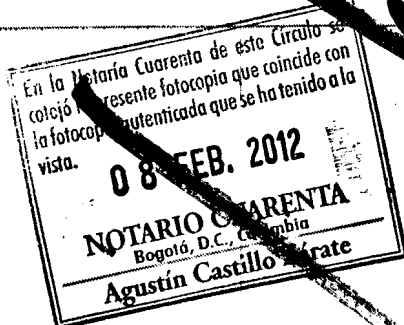


que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

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 adquiriera 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 adquiriera 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



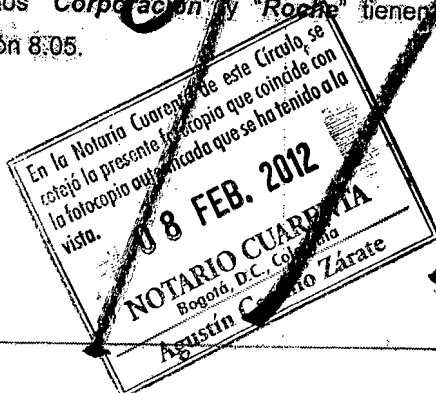
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó de Roche Holdings, Inc.

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

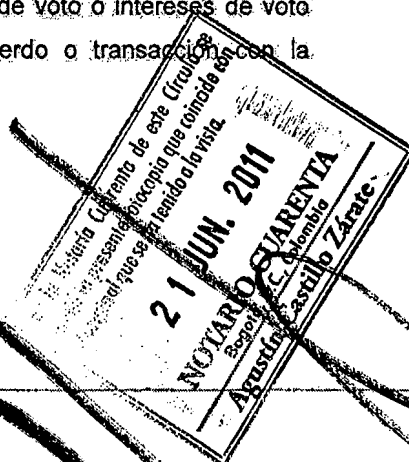
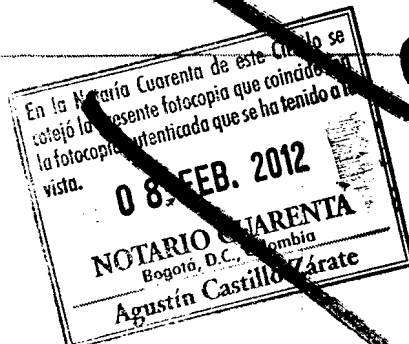


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o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

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

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

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



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

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

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

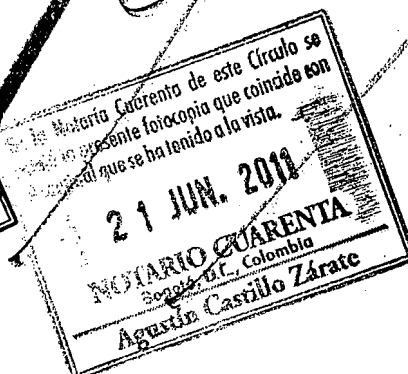
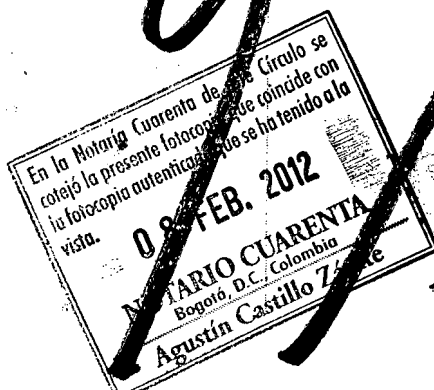
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



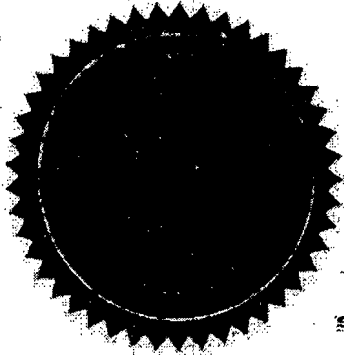
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

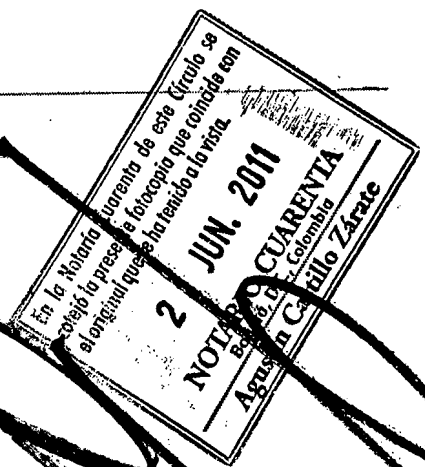
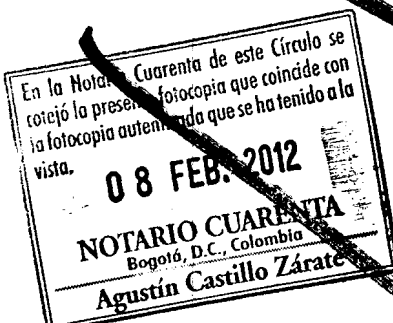
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

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



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



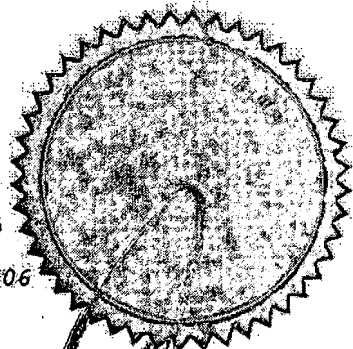
Delaware

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: 990385
DATE: 05-24-05

En la Notaría Cuarenta de este Circolo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autografa que se ha tenido a la
vista.
28 FEB. 2012
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

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

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

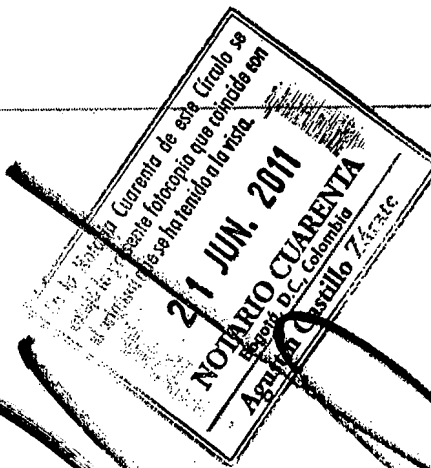
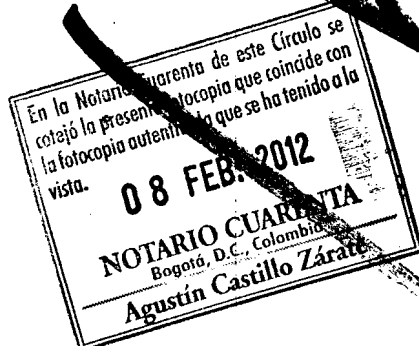
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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

GENENTECH, INC.

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

35841



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

APOSTILLA

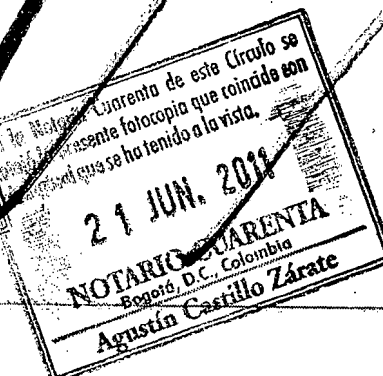
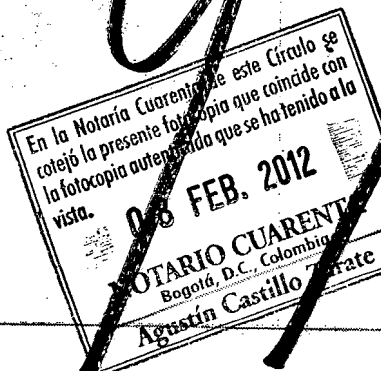
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

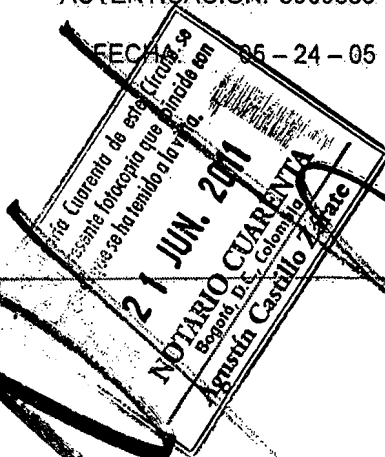
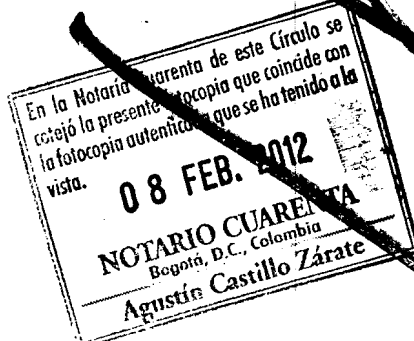


DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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

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

FECHA: 05 - 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 esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

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

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con la fotocopia autenticada que se ha tenido a la vista.
8 FEB. 2012
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Círculo 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

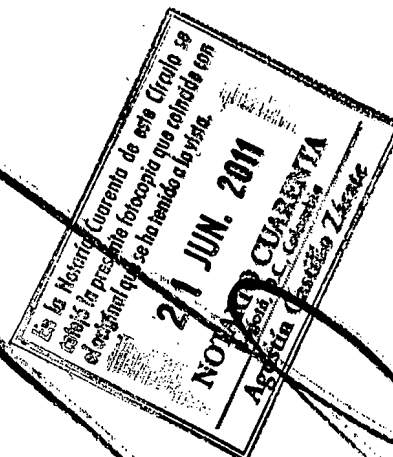
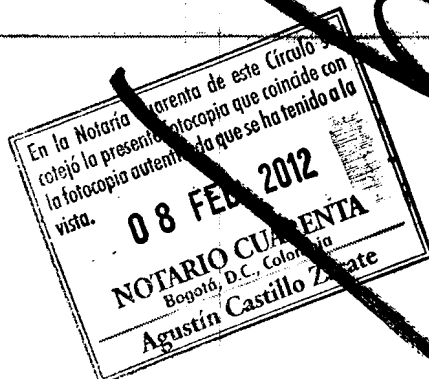
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



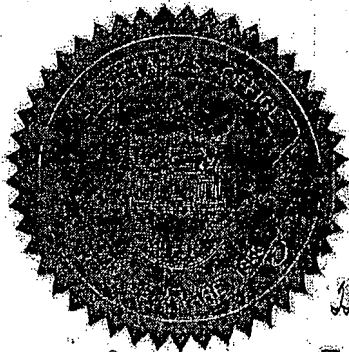
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

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



Harriet Smith Windsor
Secretary of State

En la Notaría Cuarentena de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
08 FEB. 2012
NOTARIO CUARENTENA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarentena de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTENA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

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.



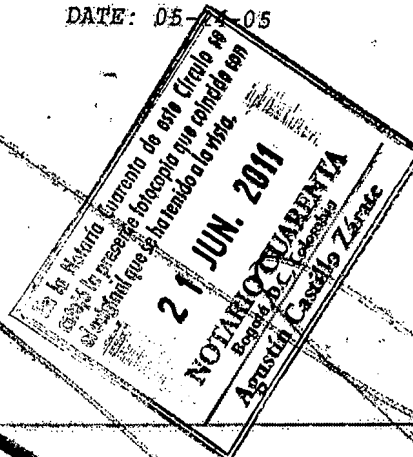
2112549

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
SRV 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

#153087

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se
celebró la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
08 FEB. 2012
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se
celebró 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

APOSTILLA

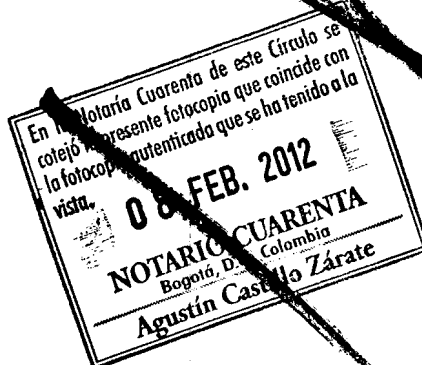
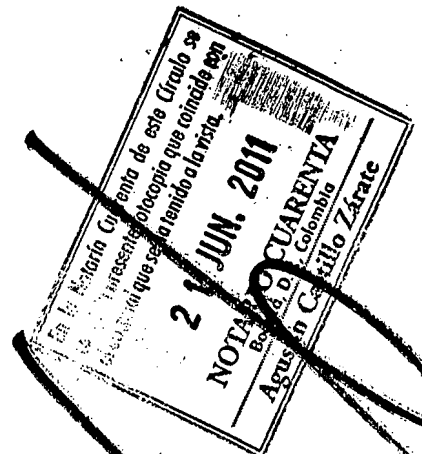
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

Certificado *

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

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

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia auténtica que se ha tenido a la
vista.
08 FEB. 2012
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia auténtica 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.

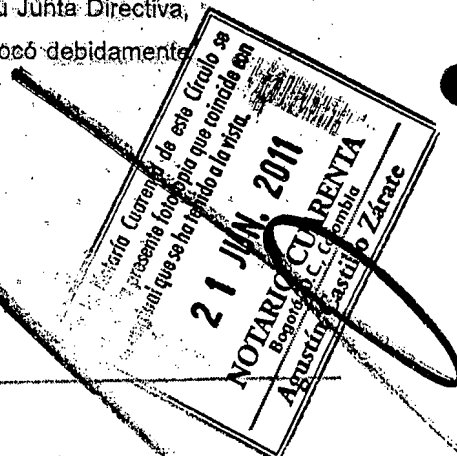
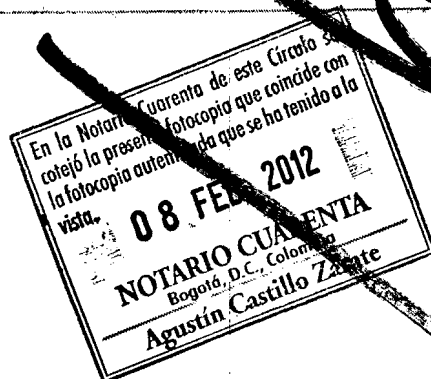
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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 esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

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



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.

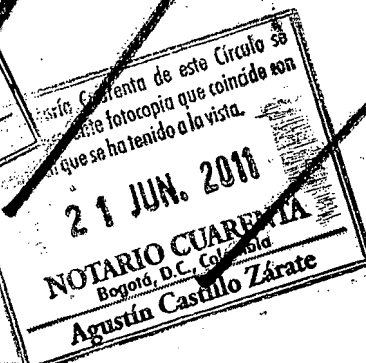
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



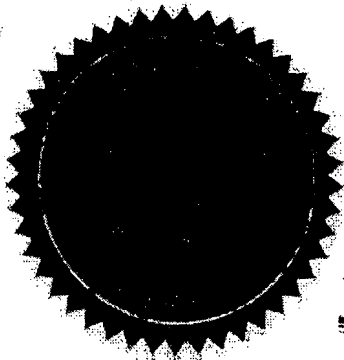
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

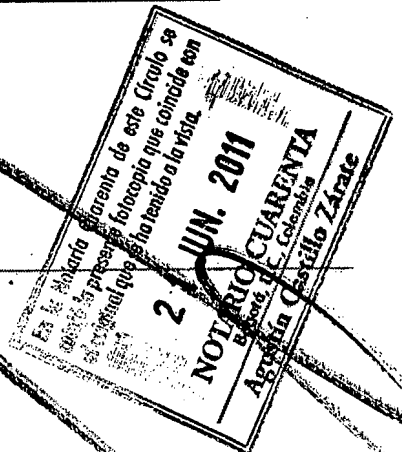
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

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

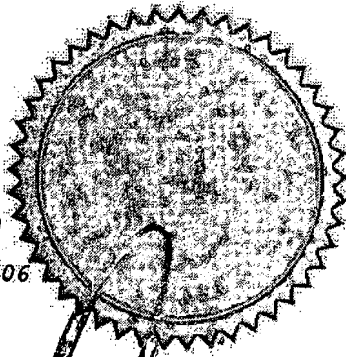
PAGE 1

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.

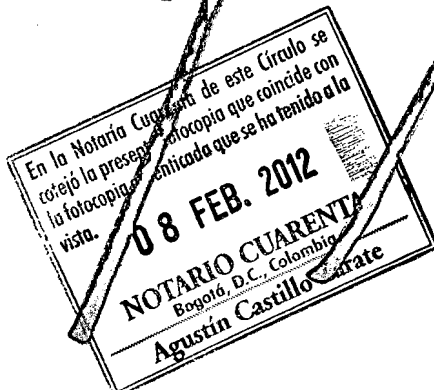
2112549

050426506



Harriet Smith Windsor
 Harriet Smith Windsor, Secretary of State
 AUTHENTICATION: 9900386

DATE: 05-24-05



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

APOSTILLA

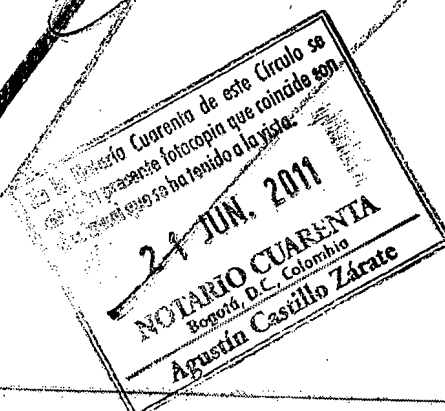
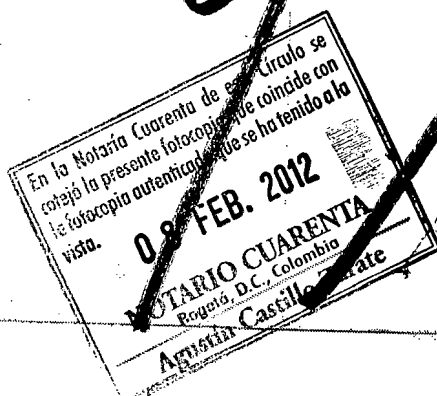
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

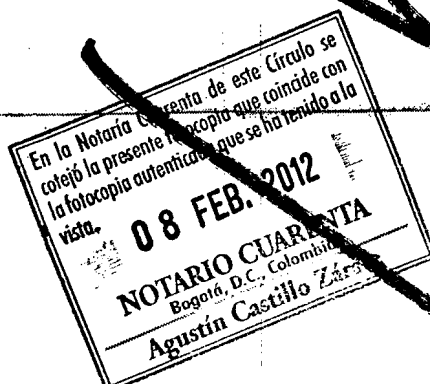


DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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 (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 05 JUN 2001

FECHA: 05 JUN 2001



**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.

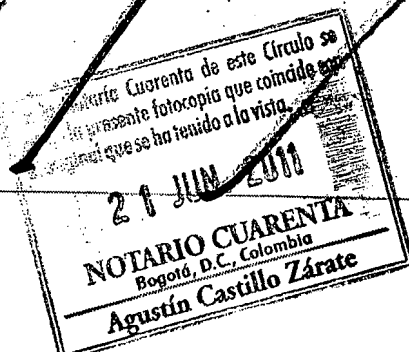
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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 votaron a favor de la enmienda.



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

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

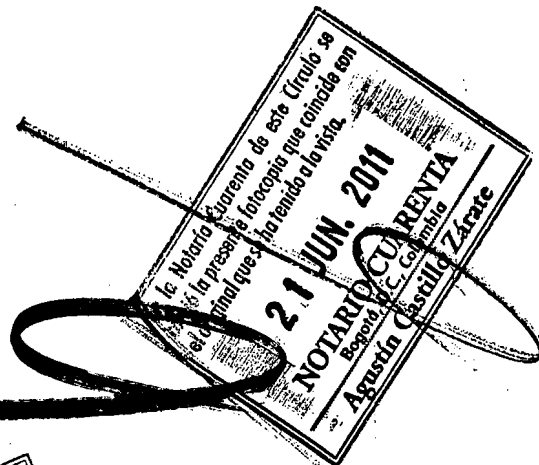
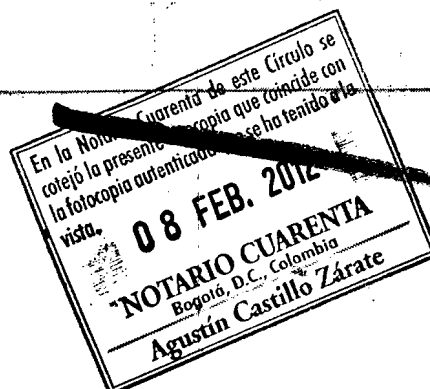
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.





SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-029506- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 16:27:52

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 122

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐