



No. 12-129536-00000-0000
Fecha: 2012-08-01 16:10:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 152

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER OVÁRICO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

GENENTECH, INC. Y F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

71. SOLICITANTE _____

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA Y
BASEL, SUIZA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

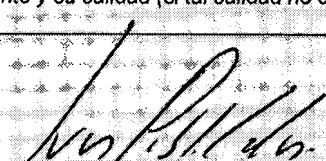
22. SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-129535- -00000-0000 Fecha: 2012-08-01 16:10:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 152
---	---

AS. 121.591

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/025651	Fecha 22.02.2011
Publicación Internacional No.		WO 2011/106300	Fecha 01.09.2011
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER OVÁRICO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria.		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
1 GENENTECH, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO	
1 DNA Way, 94080			
CIUDAD		CORREO ELECTRÓNICO	
South San Francisco			
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O	
CA		CA	
PAÍS DE RESIDENCIA		LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
US			
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. DUPONT		Jakob	US
2. IRL		Cornelia	DE
3.			
4.			
5.			
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
1. US		CA	South San Francisco
2. CH			Basel
3.			
4.			
5.			
DIRECCIÓN			
c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080			
Grenzacherstrasse 124, 4070			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO		JUAN PABLO	C.C . 80.410.337 T.P . 57492
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO	
Calle 70A 4 41		7442200	
CIUDAD		CORREO ELECTRÓNICO	
Bogotá, D.C.			
PAÍS		No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
CO			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1. US		US	61/307,095
2. US		US	61/351,231
3. US		US	61/360,059
4. US		US	61/439,819
			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
			2010.02.23
			2010.06.03
			2010.06.30
			2011.02.04

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 12-63056, 12-75869		
Fecha: 31.07.2012				
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
				
17	ANEXOS			
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 5-103 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 44 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 113-120 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital. </td> <td style="vertical-align: top;"> Documentación Jurídica 9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☒ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10. </td> </tr> </table>			Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 5-103 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 44 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 113-120 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☒ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 5-103 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 44 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 113-120 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☒ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.			

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			FECHA DE PRESENTACIÓN	
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2. F. HOFFMANN-LA ROCHE AG 3. 4.				
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2. CH 3. 4.			Basel	Grenzacherstrasse 124, 4070
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2. 3. 4.				CH
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.				
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.				
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
5. 6. 7. 8. 9. 10.				

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 September 2011 (01.09.2011)(10) International Publication Number
WO 2011/106300 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/22 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)(74) Agents: PLEASURE, Irene, T. et al.; Genentech, Inc., 1
DNA Way, MS-49, South San Francisco, CA 94080-4990
(US).

(21) International Application Number:

PCT/US2011/025651

(22) International Filing Date:

22 February 2011 (22.02.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/307,095 23 February 2010 (23.02.2010) US
61/351,231 3 June 2010 (03.06.2010) US
61/360,059 30 June 2010 (30.06.2010) US
61/439,819 4 February 2011 (04.02.2011) US(71) Applicant (for all designated States except AL, AT, BA,
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, RS, SE, SI, SK, SM, TR, US):
GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San
Francisco, CA 94080-4990 (US).(71) Applicant (for all designated States except US): F.
HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacher-
strasse 124, 4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DUPONT, Jakob
[US/US]; c/o Genentech, 1 DNA Way, South San Fran-
cisco, CA 94080 (US). IRL, Cornelia [DE/CH]; Gren-
zacherstrasse 124, 4070 Basel (CH).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
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, RS, 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))
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:
15 December 2011

WO 2011/106300 A3

(54) Title: ANTI-ANGIOGENESIS THERAPY FOR THE TREATMENT OF OVARIAN CANCER

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

TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER OVÁRICO

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud provisoria de los Estados Unidos Acta No.61/439.819, presentada el 4 de febrero de 2011, la Solicitud provisoria de los Estados Unidos Acta No.61/360.059, presentada el 30 de junio de 2010, la Solicitud provisoria de los Estados Unidos Acta No.61/351.231, presentada el 3 de junio de 2010 y la Solicitud provisoria de los Estados Unidos Acta No.61/307.095, presentada el 23 de febrero de 2010, las memorias descriptivas de las cuales se incorporan a la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona, en general, con el tratamiento de enfermedades y trastornos patológicos humanos. Más específicamente, la invención se relaciona con la terapia anti-angiogénesis, ya sea sola o en combinación con otras terapias anticancerosas, para el tratamiento del cáncer ovárico.

Antecedentes

El cáncer sigue siendo una de las más mortales amenazas para la salud humana. En los Estados Unidos, el cáncer afecta a casi 1,3 millón de nuevos pacientes cada año y es la segunda causa más importante de muerte después de la enfermedad cardíaca, que es responsable de aproximadamente 1 por cada 4 muertes. En el caso de las mujeres con cáncer de ovario o peritoneo, tras el diagnóstico quirúrgico inicial, la determinación de estadio y la citorreducción, la quimioterapia sistémica primaria standard para las mujeres con cáncer epitelial avanzado y primario peritoneal consiste en quimioterapia con una combinación de platino y taxano, habitualmente carboplatino y paclitaxel. Ver, por ej., McGuire WP, et al. *Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in pacientes con Estadio III and Estadio IV ovarian cancer*. N Eng J Med 334:1–6, 1996; Piccart MJ, et al. *Randomized intergroup trial of cisplatin–paclitaxel versus cisplatin–cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results*. J Natl Cancer Inst 92:699–708, 20003; Alberts DS, et al. *Improved therapeutic index of carboplatin plus cyclophosphamide versus cisplatin plus cyclophosphamide: final report by the Southwest Oncology Group of a phase III randomized trial in stages III and IV ovarian cancer*. J Clin Oncol 10:706–17,

1992; du Bois A, et al. *A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer*. *J Natl Cancer Inst* Sep.3;95.(17):1320.–9. 95:1320, 2003; Ozols RF, et al. *Phase III trial of carboplatin y paclitaxel compared with cisplatin y paclitaxel in pacientes con optimally resected Estadio III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study*. *J Clin Oncol* 21:3194–200, 2003 y Swenerton K, et al. *Cisplatin–cyclophosphamide versus carboplatin–cyclophosphamide in advanced ovarian cancer: a randomized phase III study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. *J Clin Oncol* 10:718–26, 1992. Si bien se han realizado avances en el control de los pacientes, esta enfermedad aún acarrea un alto índice de mortalidad por caso respecto de todas las malignidades ginecológicas diagnosticadas en los Estados Unidos. Se estima que, en 2004 se diagnosticarán 25.580 nuevos casos y 16.090 mujeres habrán muerto de la enfermedad. Ver, *por ej.*, Jemal A, et al. *Cancer statistics, 2004*. *CA Cancer J Clin* 54:8–29, 2004. Se necesitan mejoras de las estrategias terapéuticas primarias.

La angiogénesis es un evento celular importante en el cual proliferan las células del epitelio vascular, se recortan y reorganizan para formar nuevos vasos en la red vascular preexistente. Hay evidencias contundentes de que el desarrollo de un abastecimiento vascular es esencial para los procesos proliferativos normales y patológicos (Folkman y Klagsbrun *Science* 235:442–447(1987)). La administración de oxígeno y nutrientes, como así también la eliminación de los productos catabólicos, representan los pasos limitantes de la velocidad en la mayoría de los procesos de desarrollo que tienen lugar en los organismos multicelulares.

Aunque la inducción de nuevos vasos sanguíneos se considera el modo predominante de angiogénesis tumoral, los datos recientes indican que ciertos tumores crecen invadiendo los vasos sanguíneos huésped existentes. Seguidamente la vasculatura invadida retrocede, llevando a la regresión del tumor, que eventualmente se revierte mediante angiogénesis inducida por hipoxia en el margen del tumor. Holash et al. *Science* 284:1994–1998 (1999).

Uno de los reguladores positivos clave tanto de la angiogénesis normal como de la anormal es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)–A. El VEGF–A es parte de una familia de genes que incluye VEGF–B, VEGF–C, VEGF–D, VEGF–E, VEGF–F y PlGF. VEGF–A se une principalmente a dos tirosina quinasas receptoras de alta afinidad, VEGFR–1 (Flt–1) y VEGFR–2 (Flk–1/KDR), siendo esta última la principal transmisora de señales mitogénicas de las células

del endotelio vascular de VEGF-A. Además, se ha identificado a la neuropilina-1 como receptor para las isoformas de unión a heparina del VEGF-A, y puede desempeñar una función en el desarrollo vascular.

Además de constituir un factor angiogénico en la angiogénesis y vasculogénesis, VEGF, como factor de crecimiento pleiotrópico, exhibe múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos tales como la supervivencia de las células endoteliales, la permeabilidad de los vasos y la vasodilatación, la quimiotaxis de los monocitos y el influjo del calcio. Ferrara y Davis-Smyth (1997), *supra*. Más aun, los estudios han dado a conocer los efectos mitogénicos del VEGF sobre unos pocos tipos de células no endoteliales tales como las células epiteliales del pigmento retinal, las células de los conductos pancreáticos y las células de Schwann. Guerrin et al. J. Cell Physiol. 164:385-394 (1995); Oberg-Welsh et al. Mol. Cell. Endocrinol. 126:125-132 (1997); Sondell et al. J. Neurosci. 19:5731-5740 (1999). La expresión de VEGF está regulada a más en una mayoría de malignidades y la sobreexpresión del VEGF con frecuencia se correlaciona con un estadio más avanzado o con una prognosis más desfavorable en muchos tumores sólidos.

Dado que el cáncer de ovario es aún una de las amenazas más letales, se necesitan más tratamientos del cáncer para los pacientes. La invención aborda ésta y otras necesidades, como se pondrá en evidencia tras la lectura de la siguiente descripción.

SÍNTESIS

Se da a conocer el uso de antagonistas anti-VEGF para el tratamiento del cáncer ovárico. Por ejemplo, se presentan usos del anticuerpo anti-VEGF para tratar con eficacia las mujeres con carcinoma de ovarios, trompa de Falopio recién diagnosticado, sin tratamiento anterior o cáncer de peritoneo primario o carcinoma de ovario, primario del peritoneo o trompas de Falopio recurrente (o con tratamiento anterior) sensible al platino. Se presentan datos de un estudio clínico aleatorizado en fase III de bevacizumab (AVASTIN®) en combinación con regímenes quimioterapéuticos en sujetos (por ej., mujeres) con cáncer de epitelio ovárico, primario peritoneal o de trompas de Falopio en estadio III (con citorreducción subóptima u óptima macroscópica) y IV diagnosticado sin tratamiento anterior (Ejemplo 1). También se presentan datos correspondientes a un ensayo clínico aleatorizado en fase II de bevacizumab (AVASTIN®) en combinación con regímenes quimioterapéuticos en sujetos (por ej., mujeres) con cáncer epitelial ovárico, de trompas de Falopio o peritoneal primario recién

diagnosticado en estadio I y IIa de alto riesgo (Grado 3 o carcinoma de células claras solamente) y estadio IIb – IV, que se han sometido a cirugía inicial y que no serían tenidas en cuenta para cirugía citorreductora antes del progreso de la enfermedad (Ejemplo 2). También se presentan datos de un estudio aleatorizado multicéntrico con control con placebo en Fase III que evalúa la eficacia y seguridad del bevacizumab (15 mg/kg, Día 1, cada 21 días), administrado en combinación con carboplatino (área bajo la curva [AUC] 4, Día 1, cada 21 días) con gemcitabina (1000 mg/m², Día 1 y Día 8, cada 21 días) en mujeres con carcinoma del epitelio ovárico, peritoneal primario o de trompas de Falopio recurrente sensible al platino (Ejemplo 3). Esos regímenes quimioterapéuticos incluyen la terapia de taxano (por ej., paclitaxel o docetaxel), quimioterapia con base de platino (por ej., carboplatino) o gemcitabina y combinaciones de los mismos. El éxito de las pruebas demuestra que la administración del anticuerpo anti-VEGF (por ej., bevacizumab) en combinación con quimioterapia y continuada como terapia de mantenimiento ofrece beneficios estadísticamente significativos y clínicamente manifiestos a las pacientes con cáncer ovárico.

Los resultados obtenidos en los estudios clínicos del uso del bevacizumab tanto en el tratamiento simultáneo como de mantenimiento en sujetos humanos con cáncer ovárico sin tratamiento anterior y recurrente demuestran que la eficacia, evaluada por la sobrevida sin progreso (PFS) fue positiva, especialmente en comparación con los datos de PFS correspondientes al tratamiento con agentes quimioterapéuticos solamente. Los sujetos incluidos en los ensayos clínicos que recibieron bevacizumab en tratamiento concomitante en combinación con terapia de taxano (por ej., paclitaxel o docetaxel) y quimioterapia basada en platino (por ej., carboplatino) o quimioterapia basada en platino (por ej., carboplatino) y gemcitabina y terapia de mantenimiento con bevacizumab exhibieron un aumento de la sobrevida sin progreso en comparación con los sujetos tratados con terapia de taxano (por ej., paclitaxel o docetaxel), y quimioterapia basada en platino (por ej., carboplatino) sola o quimioterapia basada en platino (por ej., carboplatino) y gemcitabina sola.

En consecuencia, la invención presenta un método para tratar a una paciente con diagnóstico de cáncer ovárico sin tratamiento previo o recurrente, que comprende someter a la paciente a un régimen de tratamiento que combina por lo menos una quimioterapia con la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF, y luego administrar el anticuerpo anti-VEGF para la terapia de mantenimiento, donde con dicho tratamiento se incrementa la sobrevida del

paciente sin progreso. El régimen de tratamiento que combina la quimioterapia con la administración del anti-VEGF y luego la administración de la terapia de mantenimiento anti-VEGF prolonga con eficacia la supervivencia del paciente sin progreso (PFS).

En ciertas realizaciones, la PFS se prolonga aproximadamente 1 mes, 1,2 meses, 2 meses, 2,9 meses, 3 meses, 3,8 meses, 4 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, etc, en comparación con un control. En una realización, la PFS se prolonga de aproximadamente 2,9 meses a 3,8 meses (por ej., con el régimen de tratamiento que combina la quimioterapia con la administración del anti-VEGF y luego la administración de terapia de mantenimiento con anti-VEGF) en comparación con un control. En una realización, la PFS se prolonga por lo menos aproximadamente 3,8 meses (por ej., con el régimen de tratamiento que combina la quimioterapia con la administración del anti-VEGF y luego la administración de terapia de mantenimiento con anti-VEGF) en comparación con un control. En otra realización, la PFS se prolonga aproximadamente 2,3 meses (por ej., con el régimen de tratamiento que combina la quimioterapia con la administración del anti-VEGF y luego la administración de terapia de mantenimiento con anti-VEGF) en comparación con un control. En una realización, la PFS se prolonga aproximadamente 6 meses (por ej., con el régimen de tratamiento que combina la quimioterapia con la administración del anti-VEGF y luego la administración de terapia de mantenimiento con anti-VEGF) en comparación con un control.

Se puede utilizar cualquier agente quimioterapéutico que exhiba actividad anticancerosa de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es seleccionado del grupo que consiste en 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 la topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación del platino, taxanos urea sustituida con antracenediona, derivados de metil hidrazina, supresor adrenocortical, adrenocorticoesteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógeno, andrógenos, antiandrógeno, gemcitabina y análogo de la hormona liberadora de gonadotropina. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es, por ejemplo, taxano, paclitaxel, docetaxel, partículas unidas a la proteína paclitaxel (por ej., Abraxane®), gemcitabina, análogos de platino, carboplatino o combinaciones de los mismos. Se pueden utilizar dos o más agentes quimioterapéuticos en un

cocktail a administrar en combinación con la administración del anticuerpo anti-VEGF, por ej., taxano y análogos de platino o gemcitabina y análogos de platino. En una realización, es carboplatino y paclitaxel. En una realización, es carboplatino y docetaxel. En otra realización, es gemcitabina y carboplatino.

Los beneficios clínicos de los tratamientos de acuerdo con la presente invención se pueden medir, por ejemplo, según la duración de la sobrevida sin progreso (PFS), el tiempo transcurrido hasta el fracaso del tratamiento, la tasa de respuesta objetiva y la duración de la respuesta.

También se presentan kits. En una realización, se presenta un kit para tratar el cáncer ovárico sin tratamiento anterior en un paciente humano, que comprende un envase que contiene una composición de anticuerpo anti-VEGF e instrucciones para usar la composición de anticuerpo anti-VEGF en combinación con terapia de taxano y carboplatino seguida por una terapia de mantenimiento con anti-VEGF, donde las instrucciones aclaran que la sobrevida libre de progreso en el caso de pacientes que reciben terapia de taxano y terapia de carboplatino y bevacizumab es de 14,1 meses con una relación de riesgo de 0,717 (valor de $p < 0,0001$). En otra realización, se presenta un kit para tratar el cáncer ovárico sin tratamiento anterior en una paciente humana, que comprende un envase que contiene una composición de anticuerpo anti-VEGF e instrucciones para usar la composición de anticuerpo anti-VEGF en combinación con paclitaxel y carboplatino seguida por una terapia de mantenimiento con anti-VEGF, donde las instrucciones aclaran que la sobrevida libre de progreso en el caso de pacientes que reciben paclitaxel, carboplatino y anticuerpo anti-VEGF es de 18,3 meses con una relación de riesgo de 0,79. En ciertas realizaciones, un kit comprende un anticuerpo anti-VEGF que 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 DWWGQGTLLV VSS (SEC ID No. 1)

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

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEC ID No. 2).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab en el kit. En ciertas realizaciones, el kit es para una paciente que tiene cáncer ovárico en estadio III o IV.

En consecuencia, la invención presenta un método para instruir a un sujeto humano acerca de, por ej., el cáncer ovárico ofreciéndole instrucciones para recibir tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF a fin de aumentar la supervivencia sin progreso del sujeto, para reducir el riesgo del sujeto de recurrencia del cáncer o para aumentar las probabilidades de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones el método comprende además ofrecer instrucciones para recibir tratamiento con por lo menos un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el método comprende además ofrecer instrucciones para recibir tratamiento con por lo menos dos agentes quimioterapéuticos. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF es tanto simultáneo como subsiguiente al tratamiento con el agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones se trata al sujeto de acuerdo con lo indicado por el método de instrucción.

La invención presenta asimismo un método de promoción, que comprende promover la administración de un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento, por ejemplo, del cáncer ovárico en un sujeto humano. En algunas realizaciones, el método comprende además promover la administración de por lo menos un agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones de la invención, la administración del anticuerpo anti-VEGF es tanto simultáneo como subsiguiente a la administración del o los agentes quimioterapéuticos. La promoción se puede llevar a cabo por cualquier medio disponible. En algunas realizaciones la promoción consiste en un prospecto del envase que acompaña a la formulación comercial del anticuerpo anti-VEGF. La promoción puede ser también mediante un prospecto que acompaña a una formulación comercial del agente o agentes quimioterapéuticos. La promoción puede consistir en una comunicación escrita u oral a un médico o profesional de la salud. En algunas realizaciones la promoción se realiza mediante un prospecto, donde el prospecto presenta instrucciones para recibir terapia simultánea con un anticuerpo anti-VEGF y por lo menos un agente quimioterapéutico y terapia de mantenimiento con un anticuerpo anti-VEGF. En algunas realizaciones la promoción va seguida por el tratamiento del sujeto con un anticuerpo anti-VEGF con uno o más agentes quimioterapéuticos seguido por terapia de mantenimiento con un anticuerpo anti-VEGF.

La invención presenta un método comercial, que comprende la comercialización de un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento, por ej., del cáncer de ovario en un sujeto humano en combinación con por lo menos un agente quimioterapéutico seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF a

fin de prolongar la sobrevida sin progreso o reducir las probabilidades de recurrencia del cáncer del sujeto o aumentar las probabilidades de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones a la comercialización le sigue el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con el o los agentes quimioterapéuticos seguido por la terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En algunas realizaciones el método comprende además la comercialización de dos o más agentes quimioterapéuticos para usar en combinación con el anticuerpo anti-VEGF seguida por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En algunas realizaciones a la comercialización le sigue el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con los agentes quimioterapéuticos seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.

También se da a conocer un método comercial, que comprende la comercialización de un agente quimioterapéutico en combinación con un anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF para el tratamiento de, por ej., el cáncer ovárico en un sujeto humano a fin de prolongar la sobrevida sin progreso, o reducir las probabilidades de recurrencia del cáncer del sujeto o aumentar las probabilidades de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, a la comercialización sigue el tratamiento del sujeto con la combinación del agente quimioterapéutico y el anticuerpo anti-VEGF seguido por la terapia de mantenimiento con anti-VEGF. Se presenta asimismo un método comercial, que comprende la comercialización de dos o más agentes quimioterapéuticos en combinación con un anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF para el tratamiento de, por ej., el cáncer ovárico en un sujeto humano a fin de prolongar la sobrevida sin progreso, o reducir las probabilidades de recurrencia del cáncer del sujeto o aumentar las probabilidades de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, a la comercialización sigue el tratamiento del sujeto con la combinación de los agentes quimioterapéuticos y el anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.

En cada uno de los métodos de la invención el anticuerpo anti-VEGF puede ser sustituido con un antagonista específico del VEGF, por ej., una molécula receptora de VEGF o una molécula quimérica receptora de VEGF como se describe más adelante. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab. El anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo completamente humano o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos

ilustrativos útiles en los métodos de la invención incluyen bevacizumab (AVASTIN®), un anticuerpo G6, un anticuerpo B20 y fragmentos de los mismos. 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 PGKGGLEWVGW
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWYF DWVGQGTLVT VSS (SEC ID No. 1)

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

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEC ID No. 2).

El anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, 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 consiste en una combinación de un antagonista específico de VEGF, por ej., anticuerpo anti-VEGF, y por lo menos un agente quimioterapéutico seguido por la terapia de mantenimiento con el antagonista de VEGF. En una realización, el tratamiento consiste en una combinación de un antagonista específico de VEGF, por ej., anticuerpo anti-VEGF, y dos o más agentes quimioterapéuticos seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.

Cada uno de los métodos o usos de la invención se puede poner en práctica con relación al tratamiento de cánceres que incluyen, aunque no a modo de limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Entre los ejemplos más específicos de dichos cánceres se cuentan el cáncer ovárico, cáncer peritoneal primario de ovarios, cáncer de ovarios y trompas de Falopio, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón escamoso, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de cánceres de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, el sujeto

no ha recibido tratamiento previo de cáncer ovárico. En alguna realización, la paciente tiene un cáncer ovárico recién diagnosticado sin tratamiento previo. En algunas realizaciones, la sujeto tiene cáncer peritoneal primario del epitelio ovárico o de trompas de Falopio en estadio III (citorreducido de manera subóptima y óptima macroscópica) recién diagnosticado y sin tratamiento anterior. En algunas realizaciones, la sujeto tiene carcinoma epitelial ovárico, peritoneal primario o de trompas de Falopio recurrente, sensible al platino.

Cada uno de los aspectos precedentemente mencionados puede incluir además el monitoreo del sujeto para detectar la recurrencia del cáncer. El monitoreo se puede realizar, por ejemplo, evaluando la sobrevida sin progreso (PFS) o la sobrevida en general (OS) o la tasa de respuesta objetiva (ORR). En una realización, se evalúa la PFS una vez iniciado el tratamiento.

Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, las dosis preferidas del anticuerpo anti-VEGF, por ej., bevacizumab, son las descritas en la presente y pueden estar en el rango de aproximadamente 1µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, muy preferentemente de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo, aunque no a modo de limitación, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg. La frecuencia de administración ha de variar dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad. En el caso de las administraciones repetidas en el curso de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostiene hasta que el cáncer haya sido tratado o hasta alcanzar el efecto terapéutico buscado, medido según los métodos aquí descritos 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 una dosis en el rango de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo, aunque no a modo de limitación, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg. Sin embargo, pueden ser ventajosos otros regímenes de dosificación. El progreso de la terapia de la invención se monitorea fácilmente por técnicas y ensayos convencionales. En ciertas realizaciones de la invención, se administra la terapia anti-VEGF como terapia de mantenimiento. En otras realizaciones, se administra la terapia anti-VEGF durante por lo menos 14 meses (incluyendo la terapia anti-VEGF simultánea con quimioterapia y terapia de mantenimiento con anti-VEGF). En otras realizaciones, se administra la terapia anti-VEGF durante por lo menos 12 meses (incluyendo la terapia anti-VEGF simultánea con quimioterapia y terapia de mantenimiento con anti-VEGF).

En realizaciones adicionales de cada uno de los aspectos mencionados, el antagonista específico del VEGF, por ej., el anticuerpo anti-VEGF es administrado por vía local o sistémica (por ej., por vía oral o endovenosa). En otras realizaciones, un aspecto del tratamiento es con el antagonista específico del VEGF en una monoterapia o una monoterapia durante el transcurso del período de tratamiento con el antagonista específico del VEGF, por ej., en la fase de tratamiento extendida o la terapia de mantenimiento, a criterio del médico o según lo descrito en este documento. En ciertas realizaciones, se administra la terapia de mantenimiento con anti-VEGF durante por lo menos los ciclos 7 a 22 inclusive. En otras realizaciones, la terapia de mantenimiento con anti-VEGF se administra durante por lo menos los ciclos 7 a 18 inclusive.

En otras realizaciones, el tratamiento con el antagonista específico del VEGF se administra en combinación con una terapia anticancerosa adicional, incluyendo, aunque no a modo de limitación,, cirugía, terapia radiante, quimioterapia, terapia de diferenciación, bioterapia, inmunoterapia, un inhibidor de la angiogénesis, un agente citotóxico y un compuesto antiproliferativo. El tratamiento con el antagonista específico del VEGF puede incluir además cualquier combinación de los tipos de regímenes terapéuticos antes mencionados. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico y el antagonista específico del VEGF son administrados en forma simultánea seguidos por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En algunas realizaciones, dos o más agentes quimioterapéuticos y el antagonista específico del VEGF son administrados en forma simultánea seguidos por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.

En las realizaciones que incluyen una terapia anticancerosa adicional, el sujeto puede ser tratado además con la terapia anticancerosa adicional antes, durante (por ej., simultáneamente) o después de la administración del antagonista específico del VEGF. En una realización, el antagonista específico del VEGF, administrado solo o con una terapia anti-cáncer, se puede administrar como terapia de mantenimiento.

Otras características y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto en la siguiente Descripción Detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** ilustra el diseño del estudio para el ensayo de cáncer ovárico descrito en el Ejemplo 1.

La Figura 2 ilustra un diagrama del diseño del estudio para el ensayo de cáncer ovárico empleando bevacizumab (BEV) o placebo con diversas quimioterapias.

La Figura 3 ilustra eventos adversos seleccionados del ensayo ilustrado en la Figura 2.

La Figura 4 ilustra eventos adversos seleccionados por fase de tratamiento del ensayo ilustrado en la Figura 2.

La Figura 5 ilustra la sobrevida sin progreso (PFS) evaluada por el investigador del Brazo I, Brazo II y Brazo III del ensayo ilustrado en la Figura 2.

La Figura 6 ilustra los valores de PFS correspondientes al Brazo I y el Brazo III del ensayo ilustrado en la Figura 2 y las ramificaciones del uso del marcador CA-125 como determinante del progreso.

La Figura 7 ilustra un análisis de subgrupos de pacientes del Brazo III versus el Brazo I del ensayo ilustrado en la Figura 2.

La Figura 8 ilustra el diseño del estudio correspondiente al ensayo de cáncer ovárico descrito en el Ejemplo 2.

La Figura 9 ilustra un resumen del análisis de sobrevida sin progreso (PFS) del ensayo ilustrado en la Figura 8. "CP" corresponde al Brazo A de la Figura 8. "CPB7.5+" corresponde al Brazo B de la Figura 8.

La Figura 10 ilustra un gráfico de los resultados de PFS del ensayo ilustrado en la Figura 8. "CP" corresponde al Brazo A de la Figura 8. "CPB7.5+" corresponde al Brazo B de la Figura 8.

La Figura 11 ilustra el diseño del estudio correspondiente al ensayo de cáncer ovárico descrito en el Ejemplo 3.

Descripción detallada

I. Definiciones

El término "VEGF" o "VEGF-A" se utiliza para referirse al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos y los factores de crecimiento del endotelio vascular humano de 121, 145, 189 y 206 aminoácidos descritos, por ej., por Leung et al. *Science*, 246:1306 (1989) y Houck et al. *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991), junto con las formas alélicas y procesadas de origen natural de los mismos. VEGF-A es parte de una familia de genes que incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF. VEGF-A se une principalmente a dos tirosina quinasas receptoras de alta afinidad de alta afinidad, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), siendo este último el transmisor principal de señales mitogénicas de las células endoteliales vasculares

de VEGF-A. Además, se ha identificado a la neuropilina-1 como receptor para las isoformas de unión a heparina del VEGF-A, y puede desempeñar una función en el desarrollo vascular. El término "VEGF" o "VEGF-A" se refiere asimismo a los VEGFs de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. En ocasiones, el VEGF de una especie específica está indicado por términos tales como hVEGF en el caso del VEGF humano o mVEGF en el caso del VEGF murino. El término "VEGF" se utiliza también para referirse a formas truncadas o fragmentos del polipéptido que comprende los 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 estar identificada en la solicitud, por ej., por "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" o "VEGF165." Las posiciones de aminoácidos correspondientes a un VEGF nativo "truncado" están numeradas como se indica en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en el VEGF truncado nativo también es la posición 17 (metionina) en el VEGF nativo. El VEGF truncado nativo tiene afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 comparable a la del VEGF nativo.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. El anticuerpo seleccionado tiene normalmente una afinidad de unión por VEGF, por ejemplo, el anticuerpo se puede unir a hVEGF con un valor K_d de entre 100 nM-1 pM. Las afinidades de los anticuerpos se pueden determinar, por ejemplo, por medio de un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (tal como el ensayo BIAcore descrito en la Publicación de Solicitud PCT No. WO2005/012359); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y ensayos de competencia (por ej. RIA's). En ciertas realizaciones, se puede emplear el anticuerpo anti-VEGF de la invención como agente terapéutico en el direccionamiento e interferencia con enfermedades o trastornos en los cuales está implicada la actividad del VEGF. Además, se puede someter al anticuerpo a otros ensayos biológicos, por ej., para evaluar su efectividad como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno objetivo y el uso pretendido del anticuerpo. Entre los ejemplos se cuentan el ensayo de inhibición de HUVEC, ensayos de inhibición del desarrollo de las células tumorales (como se describe en WO 89/06692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad mediada por complementos (CDC) (Patente de E.E.U.U. 5.500,362) y ensayos de actividad agonista o hematopoyesis (ver WO 95/27062). Un

anticuerpo anti-VEGF no se une habitualmente a otros homólogos del VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF.

Un "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula con capacidad para neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir en las actividades del VEGF, incluyendo su unión a uno o más receptores de VEGF. Entre los antagonistas del VEGF se incluyen anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a VEGF, secuestrando así su unión a uno o más receptores, anticuerpos para el receptor anti-VEGF y antagonistas del receptor de VEGF tales como inhibidores de pequeñas moléculas 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 consiguiente, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de origen natural de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia nativa puede ser aislado de la naturaleza o se lo puede producir por medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de "secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido (*por ej.*, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (*por ej.*, formas empalmadas de manera alternativa) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido.

Un polipéptido "variante" se refiere a un polipéptido biológicamente activo con por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los cuales se han agregado o suprimido uno o más residuos aminoácidos en el término N o C del polipéptido. Por lo general, una variante tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente por lo menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, y aun más preferentemente por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa.

El término "anticuerpo" se utiliza en su sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud total o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (*por ej.*, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo (*ver más adelante*), siempre que exhiban la actividad biológica buscada.

En toda la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, la numeración de los residuos de una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU según Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), que expresamente se incorpora a la presente como referencia. El "índice EU según Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo IgG1 EU humano.

En una realización, la "Kd" o "valor Kd" de acuerdo con esta invención se mide mediante un ensayo de unión radiomarcada al antígeno (RIA) realizado con la versión Fab del anticuerpo y una molécula de VEGF como se describe en el siguiente ensayo, que mide la afinidad de unión en solución de los Fabs por VEGF equilibrando el Fab con una concentración ínfima de VEGF(109) marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de VEGF sin marcar, luego capturando el VEGF unido con una placa revestida con el anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865–881). En un ejemplos, para establecer las condiciones para el ensayo, se revisten placas microtituladoras (Dynex) de un día para otro con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab anticuerpo de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y seguidamente se lo bloquea con 2% de (p/v) de seroalbúmina bovina en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no absorbente (Nunc #269620), se mezcla [^{125}I]-VEGF(109) 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés, por ej. Fab-12 Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593–4599). A continuación se incuba el Fab de interés de un día para otro; sin embargo, la incubación puede continuar por espacio de 65 horas para garantizar que se alcance el equilibrio. A continuación, se transfieren las mezclas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente durante una hora. Seguidamente se retira la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Una vez secas las placas, se agregan 150 μl /pocillo de centelleante (MicroScint-20; Packard) y se realiza el recuento de las placas en un contador gamma Topcount (Packard) por espacio de diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que den menos o igual a 20% de la unión máxima para usar en los ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra realización, la Kd o valor Kd se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial empleando un BIAcoreTM-2000 o un BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 del hVEGF (8–109) inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En pocas palabras, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)-

carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el VEGF humano con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para obtener aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del VEGF humano, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones al doble en serie de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de Tween 20 (PBST) a 25°C a un caudal volumétrico de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan los coeficientes de asociación (k_{on}) y los coeficientes de disociación (k_{off}) empleando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y disociación. Se calculó la constante disociación en equilibrio (K_d) en términos de la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ej., Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865–881. Si el coeficiente de asociación es superior a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ según el mencionado ensayo de resonancia de plasmón superficial, luego se puede determinar el coeficiente de asociación utilizando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-VEGF 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de la forma corta del VEGF humano (8–109) o VEGF de ratón medidas en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con bloqueo de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación.

Un anticuerpo “de bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es aquél que inhibe o reduce la actividad del antígeno al que se une. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista específico de VEGF se une a VEGF e inhibe la capacidad de VEGF para inducir la proliferación de las células endoteliales vasculares o para inducir la permeabilidad vascular. En ciertas realizaciones, los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben por completo o sustancialmente la actividad biológica del antígeno.

A menos que se indique lo contrario, la expresión “anticuerpo multivalente” se utiliza en toda esta memoria descriptiva para indicar un anticuerpo que comprende uno o más sitios de unión al antígeno. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente está diseñado para tener tres o más sitios de unión al antígeno y generalmente no es un anticuerpo IgM o IgA de secuencia nativa.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden sólo una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y, por consiguiente, retienen la capacidad para unirse al antígeno. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos abarcados por la presente definición se incluyen (i) el fragmento Fab que consta de los dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab con uno o más residuos de 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 solo brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341, 544–546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' ligados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpos monocatenarios (*por ej.* Fv; scFv monocatenarios) (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 comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena del polipéptido (*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) que, junto con los polipéptidos complementarios de cadena liviana, forman un par de regiones de unión al antígeno (Zapata *et al.* Protein Eng. 8(10):1057–1062 (1995) y Patente de E.E.U.U. No. 5.641.870).

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere, en el presente contexto, a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir que los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un solo antígeno. Más aun, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que por lo general incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. No se debe interpretar que el modificador "monoclonal" requiere la producción del anticuerpo por ningún método específico. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar

mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975) o se los puede preparar por métodos de ADN recombinante (ver, *por ej.*, la patente de E.E.U.U. No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" se pueden aislar asimismo de genotecas de fagos utilizando las técnicas descritas por 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 que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena liviana en estrecha asociación, que puede ser covalente por naturaleza, por ejemplo en scFv. Es en esta configuración que las tres CDRs de 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 una subserie de las mismas confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aun un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque habitualmente con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

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

En el presente contexto, el término "Regiones Determinantes de la Complementariedad" (CDRs; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los residuos aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo, la presencia de los cuales es necesaria para la unión al antígeno. Cada dominio variable tiene por lo general tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de la complementariedad puede comprender residuos aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" según la definición de Kabat (es decir aproximadamente los residuos 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97

(L3) del dominio variable de cadena liviana y 31–35 (H1), 50–65 (H2) y 95–102 (H3) del dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª. Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un “bucle hipervariable” (es decir aproximadamente los residuos 26–32 (L1), 50–52 (L2) y 91–96 (L3) del dominio variable de cadena liviana y 26–32 (H1), 53–55 (H2) y 96–101 (H3) del 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 tanto una región CDR definida de acuerdo con Kabat como un bucle hipervariable. Por ejemplo, la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo 4D5 incluye los aminoácidos 26 a 35.

“Regiones de marco” (en adelante FR) los residuos de dominio variable aparte de los residuos de las CDR. Cada dominio variable tiene, por lo general, cuatro FRs identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si se definen las CDRs de acuerdo con Kabat, los residuos de las FR de cadena liviana están situados aproximadamente en los residuos 1–23 (LCFR1), 35–49 (LCFR2), 57–88 (LCFR3) y 98–107 (LCFR4) y los residuos de FR de cadena pesada están situados aproximadamente en los residuos 1–30 (HCFR1), 36–49 (HCFR2), 66–94 (HCFR3) y 103–113 (HCFR4) de los residuos de la cadena pesada. Si las CDRs comprenden residuos aminoácidos de bucles hipervariables, los residuos FR están situados aproximadamente en los residuos 1–25 (LCFR1), 33–49 (LCFR2), 53–90 (LCFR3) y 97–107 (LCFR4) de la cadena liviana y los residuos de FR de la cadena pesada están situados aproximadamente en los residuos 1–25 (HCFR1), 33–52 (HCFR2), 56–95 (HCFR3) y 102–113 (HCFR4) de los residuos de la cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende aminoácidos tanto de una CDR definida por Kabat como los de un bucle hipervariable, los residuos FR se ajustan de manera correspondiente. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26–H35, los residuos de FR1 de cadena pesada están en las posiciones 1–25 y los residuos de FR2 están en las posiciones 36–49.

El fragmento “Fab” contiene un dominio variable y constante de la cadena liviana y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ comprenden un par de fragmentos Fab que, por lo general, están covalentemente ligados cerca de sus términos carboxi por cisteínas bisagra entre los mismos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos son conocidos en la técnica.

Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenarios” o “scFv” comprenden

los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una sola cadena del polipéptido. En general, el polipéptido Fv comprende además un ligante polipéptido entre los dominios V_H y V_L , lo que habilita al scFv para formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para obtener una reseña de los scFv, remitirse a Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269–315 (1994).

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena liviana (V_L) en la misma cadena del polipéptido (V_H y V_L). Utilizando un ligante que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y generar dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo en 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 por Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10):1057–1062 (1995). En pocas palabras, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H - C_H1 - V_H - C_H1) que, junto con los polipéptidos de cadena liviana complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen específicamente los anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga de las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de una especie específica o que pertenecen a una determinada clase o subclase de anticuerpos, en tanto que el resto de la cadena (o cadena) es idéntico u homólogo de las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, como así también los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica ventajosa (Patente de E.E.U.U. No. 4,816,567; and 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 que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su gran mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales se reemplazan

los residuos de una región hipervariable del receptor por los residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano con la especificidad, afinidad y capacidad pretendidas. En algunos casos, los residuos de la región de marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Más aun, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar aun más la eficiencia de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado suele comprender sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado suele comprender asimismo por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Por más detalles, recurrir a Jones *et al.*, Nature 321:522–525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323–329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593–596 (1992).

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde al de un anticuerpo producido por un humano y/o que ha sido creado utilizando cualquiera de las técnicas para la creación de anticuerpos humanos descritas en la presente. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir empleando diversas técnicas conocidas en el arte. En una realización, el anticuerpo humano es seleccionado de una biblioteca de fagos, biblioteca de fagos que expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.* Nature Biotechnology 14:309–314 (1996); Sheets *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6157–6162 (1998)); Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). También se pueden preparar anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ej., ratones en los cuales los genes endógenos de inmunoglobulina humana han sido parcial o completamente inactivados. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la vista en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento génico y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia ha sido descrita, en las Patentes de Estados Unidos

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 and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65–93 (1995). Por otro lado, el anticuerpo humano se puede preparar mediante la inmortalización de los linfocitos B humanos para producir 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 la patente de Estados Unidos No. 5.750.373.

Un anticuerpo “con afinidad madurada” es aquel que tiene una o más alteraciones en una o más CDRs del mismo, que den lugar a una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo progenitor que no posee esa alteración (o alteraciones). Los anticuerpos con afinidad madurada preferidos tienen afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno objetivo. Los anticuerpos con afinidad madurada son producidos por procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. Bio/Technology 10:779–783 (1992) describe la maduración de la afinidad mediante transposición (shuffling) de los dominios VH y VL. Se describe la mutagénesis al azar de CDR y/o residuos marco en las obras de: 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 funcional de unión al antígeno” de un anticuerpo es aquél que tiene la capacidad de unirse 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 se deriva el sitio de unión al antígeno, aunque la capacidad para unirse al antígeno debe ser valorable mediante una variedad de métodos conocidos para evaluar la unión de los anticuerpos a un antígeno. Más aun, la afinidad de unión al antígeno de cada uno de los sitios de unión al antígeno de un anticuerpo multivalente de la presente no es necesariamente igual. En el caso de los anticuerpos multiméricos de la presente, se puede evaluar el número de sitios funcionales de unión al antígeno utilizando un análisis de ultracentrifugación descrito en el Ejemplo 2 de la Publicación de solicitud de patente de Estados

Unidos No. 20050186208. De acuerdo con este método de análisis, se combinan diferentes relaciones de antígeno objetivo a anticuerpo multimérico y se calcula el peso molecular promedio de los complejos suponiendo números diferentes de sitios funcionales de unión. Se comparan estos valores teóricos con los valores experimentales reales obtenidos a fin de evaluar el número de sitios de unión funcionales.

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

Para el análisis de selección de anticuerpos que se unen a un epítipo en un antígeno unido por un anticuerpo de interés, se puede ejecutar un análisis de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

Un “anticuerpo dependiente de la especie es aqué que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamíferos. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie se “une específicamente” a un antígeno humano (es decir que tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y muy preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es por lo menos aproximadamente 50 veces o por lo menos aproximadamente 500 veces o por lo menos aproximadamente 1000 veces más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos antes definidos, aunque por lo general es un anticuerpo humanizado o humano.

En el presente contexto, “anticuerpo mutante” o “variante de anticuerpo” se refiere a una secuencia de aminoácidos variante de un anticuerpo dependiente de la especie, en la cual se ha modificado uno o más de los residuos aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie. Dichos mutantes tienen necesariamente menos de 100% de identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo dependiente de la especie. En una realización, el anticuerpo mutante tiene una secuencia de aminoácidos con por lo menos 75% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada o liviana del anticuerpo dependiente de la especie, más

preferentemente por lo menos 80%, más preferentemente por lo menos 85%, más preferentemente por lo menos 90% y muy preferentemente por lo menos 95%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en la presente en términos porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similares (es decir un residuo aminoácido del mismo grupo sobre la base de las propiedades comunes de la cadena secundaria, ver más adelante) con los residuos del anticuerpo dependiente de la especie, después de alinear las secuencias e introducir brechas, en caso de ser necesario, para obtener el máximo porcentaje de identidad de secuencia. No se debe considerar que ninguna de las extensiones N-terminales, C-terminales o internas deleciones o inserciones en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable afecta la identidad o similitud de secuencias.

Para incrementar la vida media de los anticuerpos o polipéptidos que contiene las secuencias de aminoácidos de la presente invención, se puede anexar un epítotope de rescate que se une al receptor (especialmente un fragmento de anticuerpo), de acuerdo con lo descrito, por ej., en la Patente de Estados Unidos 5.739.277. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el epítotope de rescate de unión al receptor puede estar ligada en marco a un ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptido de la presente invención por lo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico de diseño comprende el epítotope de rescate de unión al receptor y una secuencia polipeptídica de la presente invención. En el presente contexto, el término "epítotope de rescate de unión al receptor" se refiere a un epítotope 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 con vidas medias incrementadas en suero también fueron descritos en WO00/42072, WO 02/060919; Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591–6604 (2001); Hinton, J. Biol. Chem. 279:6213–6216 (2004)). En otra realización, también se puede incrementar la vida media en suero, por ejemplo, acoplándolo a otras secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, se pueden acoplar anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los métodos de la invención a albúmina sérica o a una porción de la albúmina sérica que se une al receptor FcRn o a un péptido que se une a la albúmina sérica de manera que la albúmina sérica se una al anticuerpo o polipéptido, por ej., secuencias de polipéptidos que se describen en WO01/45746. En una realización, el péptido de albúmina sérica a acoplar

comprende una secuencia de aminoácidos de DICLPRWGCLW. En otra realización, se incrementa la vida media de un Fab por estos métodos. Véase asimismo, Dennis et al. *J. Biol. Chem.* 277:35035–35043 (2002) para encontrar secuencias peptídicas que se unen a la albúmina sérica.

Una “proteína quimérica receptora del VEGF” es una molécula receptora de VEGF 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. En ciertas realizaciones, la proteína quimérica receptora de VEGF tiene capacidad para unirse e inhibir la actividad biológica del VEGF.

Un anticuerpo “aislado” es aquél que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo es purificado (1) a más de 95% en peso del anticuerpo según determinación por el método de Lowry y muy preferentemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de tazón giratorio o, o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras empleando azul Coomassie o tinción con plata. . El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de las células recombinantes, ya que por lo menos un componente del entorno natural del anticuerpo no está presente. Sin embargo, por lo general se prepara el anticuerpo aislado mediante por lo menos un paso de purificación.

El término “fragmento” se refiere a 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 total 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 “anti-angiogénesis” or “inhibidor de la angiogénesis” se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína asilada, una proteína recombinante, un anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular perjudicial, ya sea directa o indirectamente. Se ha de

entender que el agente anti-angiogénesis incluye los agentes que unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente anti-angiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico según lo definido en toda la memoria descriptiva o lo conocido en la técnica, por ejemplo, aunque no a modo de limitación, anticuerpos para VEGF-A o para el receptor VEGF-A (por ej., el receptor KDR o el receptor Flt-1), trampa de VEGF, inhibidores anti-PDGFR tales como GleevecTM (Imatinib Mesilato). Los agentes anti-angiogénesis también incluye los inhibidores de la angiogénesis nativos, por ej., angiostatina, endostatina, etc. Ver, por ej., Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ej., la Tabla 3 que enumera terapias anti-angiogénicas en el melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5:1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ej., la Tabla 2 que enumera factores antiangiogénicos conocidos) y Sato. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por ej., la Tabla 1 enumera agentes anti-angiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

Una dosis de "mantenimiento" se refiere en este contexto a una o más dosis de un agente terapéutico administrada al paciente durante o después de un período de tratamiento. Habitualmente, las dosis de mantenimiento se administran a intervalos de tratamiento separados, como por ejemplo aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas o aproximadamente cada 4 semanas. En una realización, las dosis de mantenimiento son las indicadas en la figura 1 (terapia prolongada), la figura 2 o la figura 8 o la figura 11 de la presente.

"Sobrevida" se refiere al paciente que se mantiene vivo e incluye la supervivencia sin progreso (PFS) y la supervivencia total (OS). La supervivencia se puede estimar por el método de Kaplan-Meier y cualquier diferencia de supervivencia se computa utilizando la prueba estratificada de rango logarítmico.

"Sobrevida sin progreso (PFS)" se refiere al tiempo transcurrido desde el tratamiento (o aleatorización) hasta el primer avance de la enfermedad o muerte. En un aspecto de la invención, la PFS se puede evaluar por los Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST). En un aspecto de la invención, se puede evaluar la PFS según los niveles de CA-125 como determinantes del progreso.

"Sobrevida total" se refiere a que el paciente se mantiene vivo durante un período definido de tiempo, como ser de aproximadamente 1 año,

aproximadamente 1,5 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 10 años, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En los estudios en que se basa la invención, el evento utilizado para el análisis de la sobrevida fue la muerte por cualquier causa.

La expresión “prolongación de la sobrevida” o “aumento de las probabilidades de supervivencia” se refiere al aumento de la PFS y/o OS en un paciente tratado con respecto a un paciente sin tratamiento (es decir con respecto a un paciente no tratado con un antagonista específico de VEGF, por ej., un anticuerpo VEGF) o con respecto a un protocolo de tratamiento control tal como el tratamiento sólo con el agente quimioterapéutico, tal como los que se utilizan en la atención normal en el caso del cáncer ovárico. Por ejemplo extended PFS is the time that the patient remains alive, without return of the cancer, por ej., for a defined period of time such as aproximadamente 1 mes, 2 meses, 2,3 meses, 2,9 meses, 3 meses, 3,8 meses, 4 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, etc., from initiation of treatment or from initial diagnosis, en comparación con un control (por ej., patient not treated with the same Antagonista específico de VEGF). En una realización, la PFS se prolonga aproximadamente 2,9 meses to 3,8 meses en comparación con un control. En una realización, la PFS se prolonga por lo menos aproximadamente 3,8 meses en comparación con un control. En otra realización, la PFS se prolonga by aproximadamente 2,3 meses. En una realización, la PFS se prolonga aproximadamente 6 meses en comparación con un control. En cierta realización, se monitorea la sobrevida 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., después de la iniciación del tratamiento o después del diagnóstico inicial.

La relación de riesgo (HR) es una definición estadística para la calificación de eventos. En el marco de la invención, la relación de riesgo de riesgo se define como representación de la probabilidad de un evento en el brazo experimental dividida por la probabilidad de un evento en el brazo control en cualquier punto específico de tiempo. La “relación de riesgo” en el análisis de la sobrevida sin progreso es una síntesis de la diferencia entre dos curvas de sobrevida sin

progreso, lo que representa una reducción del riesgo de muerte en el tratamiento en comparación con el control, en el curso de un período de seguimiento.

El término “concomitantemente” se refiere, en el presente contexto, a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde por lo menos parte de la administración se superpone en el tiempo. En consecuencia, la administración concomitante incluye un régimen de dosificación en que la administración de uno o más agentes continúa después de suspender la administración de uno o más agentes adicionales.

El término “monoterapia” se refiere a un régimen terapéutico que incluye sólo un único agente terapéutico para el tratamiento del cáncer o tumores durante el curso del período de tratamiento. Monoterapia usando un antagonista específico de VEGF significa que el antagonista específico del VEGF se administra en ausencia de una terapia anti-cáncer adicional durante el período de tratamiento.

La expresión “terapia de mantenimiento” se refiere a un régimen terapéutico que se da para reducir las probabilidades de recurrencia o avance. La terapia de mantenimiento se puede aplicar durante cualquier lapso de tiempo, incluyendo períodos de tiempo prolongados hasta la expectativa de vida del sujeto. La terapia de mantenimiento se puede administrar después de la terapia inicial o conjuntamente con terapias adicionales. Las dosis utilizadas para la terapia de mantenimiento pueden variar y pueden incluir dosis reducidas en comparación con las dosis utilizadas para otros tipos de terapias. En ciertas realizaciones de la invención, se administra terapia de mantenimiento durante por lo menos 16 ciclos después de completarse la quimioterapia en forma concomitante con 5 ciclos de terapia anti-VEGF. En otras realizaciones de la invención, la terapia de mantenimiento se da durante por lo menos 12 ciclos después de completarse la quimioterapia en forma concomitante con 6 ciclos de terapia anti-VEGF. En una realización, la terapia de mantenimiento es la ilustrada en la figura 1, la figura 2, la figura 8 o la figura 11.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza por lo general por el crecimiento descontrolado de las células. Se incluyen en esta definición los cánceres benignos y malignos, como así también los tumores latentes o las micrometástasis. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, aunque no a modo de limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más específicos de esos cánceres incluyen cáncer ovárico, cáncer peritoneal primario de ovarios, cáncer de ovarios y trompas de falopio, carcinoma epitelial ovárico, peritoneal primario o de

trompas de falopio recurrente sensible al platino, 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 del estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o útero, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cánceres de cabeza y cuello, como así también linfoma de células B (incluyendo linfoma no de Hodgkin de bajo grado/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL folicular de grado intermedio NHL; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de alto grado de células pequeñas no escindidas; NHL de enfermedad masiva; linfoma de células de manto; linfoma asociado al SIDA y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica y trastorno linfoproliferativo postransplante (PTLD), como así también la proliferación vascular anormal asociada a las facomatosis, edema (como el asociado a los tumores cerebrales) y síndrome de Meigs.

El término “metástasis” se refiere a la propagación del cáncer desde su sitio primario a otros puntos del cuerpo. Las células cancerosas se pueden desprender del tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular por el torrente sanguíneo y crecer en un foco distante (metastizar) en los tejidos normales de otras partes del cuerpo. . Las metástasis pueden ser locales o distantes. La metástasis es un proceso sucesivo, supeditado al desprendimiento de las células tumorales del tumor primario, que se desplazan por el torrente sanguíneo y se detienen en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un abastecimiento de sangre y pueden desarrollarse hasta formar una masa potencialmente letal.

Tanto las vías estimuladoras como inhibitorias dentro de la célula tumoral regulan este comportamiento y las interacciones entre las células tumorales y las células huésped en el sitio distante también son significativas.

La expresión “sujeto” se refiere a un mamífero, incluyendo aunque no a título de limitación, un mamífero humano o no humano tal como bovino, equino,

canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto es un humano. En la presente los pacientes también son sujetos. Por lo general, el sujeto es de sexo femenino.

En lo que respecta a los métodos de la presente invención, el término “instruir” a un sujeto significa ofrecerle indicaciones para aplicar la terapia, medicación, tratamiento, regímenes de tratamiento y demás, por cualquier medio, aunque preferentemente por escrito, como por ejemplo en forma de prospectos del envase u otro material escrito promocional.

En lo que respecta a los métodos de la presente invención, el término “promover” se refiere a ofrecer, publicitar, vender o describir una droga, combinación de drogas o modalidad de tratamiento específica, por cualquier medio, incluyendo escrito, como por ejemplo en forma de prospectos. En este caso la promoción se refiere a la promoción de un agente terapéutico, como por ejemplo un antagonista del VEGF, por ej., un anticuerpo anti-VEGF o un agente quimioterapéutico, para una indicación tal como el tratamiento del cáncer ovárico, donde dicha promoción es autorizada por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) por haberse demostrado que está asociado a una eficacia terapéutica estadísticamente significativa y seguridad aceptable en una población de sujetos.

El término “comercialización” se utiliza en la presente para describir la promoción, venta o distribución de un producto (por ej., una droga). Comercialización incluye específicamente el envasado, publicidad y cualquier actividad comercial que tenga por fin comercializar un producto.

Una “población” de sujetos se refiere a un grupo de sujetos con cáncer, como por ejemplo en un ensayo clínico o los que atienden los oncólogos después de la aprobación por la FDA para una indicación específica, como la terapia contra el cáncer ovárico.

El término “terapia anticancerosa” se refiere a una terapia que sirve para tratar el cáncer. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos anticancerosos se cuentan, aunque no a título de limitación, por ej., cirugía, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en terapia radiante, agentes anti-angiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina y otros agentes para el tratamiento del 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 la tirosina quinasa), inhibidor de HER1/EGFR (por ej., erlotinib (Tarceva®), inhibidores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (por ej., Gleevec™ (Imatinib Mesilato)), un inhibidor de la COX-2 (por ej., celecoxib), interferones, citoquinas,

antagonistas (por ej., anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de los siguientes blancos: receptor o receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. En la presente invención también se incluyen combinaciones de los mencionados.

El término “agente citotóxico” en el presente contexto se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ej., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu)), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de pequeñas moléculas o toxinas con actividad enzimática de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico ventajoso para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bullatacinona); una camptotequina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (especialmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembicina, fenesterine, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, por ej., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos tales como clodronato; una esperamicina; como así también neocarzinostatina cromóforo y antibióticos cromóforos relacionados de cormoproteína enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina,

bleomicinas, cactinomicina, carabicina; carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICINA® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatin, zorubicina; antimetabolitos 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-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositor del ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantrene; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podoilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxane; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ej., TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin Cremóforo, formulación de nanopartículas modificadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucil; 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; irinotecano (Camptosar, CPT-11) (incluyendo el régimen de

tratamiento de irinotecano con 5-FU y leucovorin); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorin (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 del VEGF-A que reducen la proliferación celular o las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los citados.

También están incluidos en esta definición los agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de las hormonas sobre los tumores tales como antiestrógenos o moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® toremifeno; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, como por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® megestrol acetato, AROMASIN® exemestane, formestanie, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol y ARIMIDEX® anastrozol y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide y goserelina; como así también troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, especialmente lo que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación aberrante de las células, como por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión del VEGF (por ej., ANGIOZYME® ribozyme) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, como por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los citados.

El término "citoquina" es un término genérico que abarca las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de citoquinas las linfoquinas monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citoquinas las hormonas del crecimiento tales como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano de N-metionilo y la hormona de crecimiento bovina, la hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina; prorelaxina; hormonas de glucoproteína tales como la hormona folículo

estimulante (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento epidérmico; el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, factor de necrosis tumoral alfa y beta, sustancia inhibitoria mulleriana, péptido asociado a la gonadotrofina 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, factores de crecimiento transformantes (TGFs) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón-alfa, -beta y -gamma factores estimulantes de colonias (CSFs) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (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 que incluyen LIF y ligando kit (KL). Empleado en este contexto, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Un "agente inhibidor del crecimiento" utilizado en este contexto se refiere a un compuesto o composición que inhibe el desarrollo de una célula *in vitro* o *in vivo*. Por consiguiente, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce significativamente el porcentaje de células en la fase S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se cuentan los agentes que incluyen los agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un lugar aparte de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (por ejemplo, vincristina y vinblastina), TAXOL® e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen al G1 también se expresan sobre la detención de la fase S, por ejemplo agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracil, y ara-C. Se puede encontrar más información en The Molecular Basis of Cáncer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la p. 13.

El término "profármaco" utilizado en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia con actividad farmacéutica que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con la droga original y tiene capacidad para activarse enzimáticamente o convertirse a la forma original más activa. Ver, por ej., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375–382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247–267, Humana Press (1985).

Los profármacos de la presente invención incluyen, aunque no a título de limitación, profármacos con contenido de fosfato, profármacos con contenido de tiofosfato, profármacos con contenido de sulfato, profármacos con contenido de péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos con contenido de beta-lactama, profármacos con contenido de fenoxiacetamida sustituida o profármacos con contenido de fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos con contenido de 5-fluorocitosina y otros profármacos con contenido de 5-fluorouridina que se pueden convertir a la droga libre citotóxica más activa. Los ejemplos de drogas citotóxicas de las que se puede derivar una forma de profármaco para usar en la presente invención incluyen, aunque no a título de limitación, los agentes quimioterapéuticos antes mencionados.

La expresión "terapia radiante" se refiere al uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir un daño suficiente a una célula para limitar su capacidad para funcionar normalmente o para destruir la célula por completo. Se apreciará que hay muchas maneras conocidas en la técnica para determinar la dosis y la duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se aplican en una administración única y las dosis típicas están en el rango de 10 a 200 unidades Grays) por día.

La expresión "reducir o inhibir" se refiere a la capacidad para causar una reducción total preferentemente de 20% o más, más preferentemente de 50% o más y muy preferentemente de 75%, 85%, 90%, 95% o más. Reducir o inhibir se puede referir a los síntomas del trastorno en tratamiento, a la presencia o tamaño de metástasis o micrometástasis, al tamaño del tumor primario a la presencia o el tamaño del tumor latente o al tamaño o número de vasos sanguíneos en los trastornos angiogénicos.

El término "infusión endovenosa" se refiere a la introducción de una droga 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, aunque, de acuerdo con la invención, por otro lado se administra la infusión endovenosa por espacio de 10 horas o menos.

El término “bolo endovenoso” o “o émbolo endovenoso” se refiere la administración de una droga en una vena de un animal o humano de tal manera que el cuerpo reciba la droga en aproximadamente 15 minutos o menos, preferentemente 5 minutos o menos.

El término “administración subcutánea” se refiere a la introducción de una droga 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 sostenida relativamente lenta desde un receptáculo de la droga. El bolsillo se puede generar pellizcando o tirando de la piel hacia arriba y alejándola del tejido subyacente.

El término “infusión infusión subcutánea” se refiere a la introducción de una droga 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 sostenida relativamente lenta desde un receptáculo de la droga durante un período de tiempo que incluye, aunque no a modo de limitación, 30 minutos o menos o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión se puede realizar mediante la implantación subcutánea de una bomba de administración de drogas implantado debajo de la piel del paciente animal o humano, donde la bomba administra una cantidad predeterminada de droga durante un período de tiempo predeterminado, como por ejemplo 30 minutos, 90 minutos o un período de tiempo que abarque la duración del régimen de tratamiento.

El término “bolo subcutáneo” se subcutánea bolus” se refiere a la introducción de una droga debajo de la piel de un paciente animal o humano, donde la administración de la droga por bolo dura preferentemente menos de aproximadamente 15 minutos, más preferentemente menos de 5 minutos y muy preferentemente menos de 60 segundos. La administración se realiza preferentemente dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, donde el bolsillo se genera, por ejemplo, pellizcando o tirando de la piel hacia arriba y alejándola del tejido subyacente.

Un “trastorno” es cualquier condición que se beneficie por el tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas o agudas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Entre los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en la presente se incluye el cáncer, los tumores benignos y malignos, las leucemias y malignidades linfoides, trastornos neuronales, de la glía,

astrocitrales, hipotalámicos y de otro tipo glandular, de macrófagos, epiteliales, estromales y blastocélulas y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de una droga para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva de la droga puede reducir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor, inhibir (es decir, retardar en alguna medida y, preferentemente, detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, inhibir (es decir, retardar en alguna medida y, preferentemente, detener) la metástasis de tumores, inhibir, en alguna medida, el desarrollo de tumores y/o aliviar en cierta medida uno o más síntomas asociados con el trastorno. El grado en que la droga puede prevenir el desarrollo y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En el caso de la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* se puede medir, por ejemplo, evaluando la duración de la sobrevida, la duración de la sobrevida sin progreso (PFS), la prolongación de la sobrevida sin progreso (PFS), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico de aquellos que necesitan dicho tratamiento que incluyen los que ya tienen el trastorno.

"Tratamiento profiláctico o preventivo" se refiere a aquellos en los cuales se ha de prevenir el trastorno.

El término "marcador" utilizado en el presente contexto se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente al polipéptido. El marcador puede ser detectable en sí (por ej., marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que sea detectable.

II. ANTICUERPOS ANTI-VEGF Y ANTAGONISTAS

En la presente se dan a conocer usos de los antagonistas anti-VEGF para el tratamiento del cáncer ovárico. La angiogénesis es uno de los procesos cardinales que llevan a la invasión y metástasis de tumores sólidos. La vía de señalización angiogénica puede ser disparada por la liberación de promotores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de las células tumorales al ambiente local. Existe evidencia creciente de que la angiogénesis desempeña una función

en el pronóstico de la enfermedad cáncer ovárico y posiblemente en el progreso y pronóstico. Ver, por ej., Yoneda J, et al., *Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice*. J Natl Cancer Inst 90:447–54, 1998; Nakanishi Y, et al. *The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial cáncer ovárico*. Int J Gynecol Pathol 16:256–62, 1997; Gasparini G, et al. *Prognostic and predictive value of tumour angiogenesis in ovarian carcinomas*. Int J Cancer 69:205–11, 1996; Hollingsworth HC, et al.,. *Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma*. Am J Pathol 147:33–41, 1995; Paley PJ, et al. *Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma*. Cancer 80:98–106, 1997; Alvarez AA, et al., *The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res 5:587–91, 1999; Gasparini G. *The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia*. Drugs 58:17–38, 1999; van Hinsbergh VW, et al.,. *Angiogenesis and anti-angiogenesis: perspectives for the treatment of solid tumors*. Ann Oncol 10 Suppl 4:60–3, 1999; Malonne H, et al.,. *Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors*. Clin Exp Metastasis 17:1–14, 1999; Folkman J. *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Eng J Med 285:1182–6, 1971; Kim KJ, et al. *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo*. Nature 362:841–4, 1993; and, Luo JC, et al., *Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in dos mouse ascites tumors by an anti vascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody*. Cancer Res 58:2594–600, 1998.

(i) *Antígeno VEGF*

El antígeno VEGF a utilizar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, la molécula VEGF₁₆₅ así como otras isoformas del VEGF o un fragmento que contenga el epítipo deseado. Otras formas de VEGF útiles para generar los anticuerpos anti-VEGF de la invención han de ser evidentes para las personas con capacitación en la técnica.

Se obtuvo el VEGF humano analizando primero una genoteca de ADNc preparada con células humanas, utilizando ADNc de VEGF bovino como sonda de hibridación. Leung *et al.* (1989) Science, 246:1306. Un ADNc identificado de esa manera codifica una proteína de 165 aminoácidos con más de 95% de homología

con el VEGF bovino; por lo general se hace referencia a esta proteína de 165 aminoácidos como VEGF humano (hVEGF) o VEGF₁₆₅. Se confirmó la actividad mitogénica del VEGF humano expresando el ADNc de VEGF humano en células huésped de mamífero. Los medios acondicionados por las células transfectadas con el ADNc de VEGF humano promovieron la proliferación de las células endoteliales capilares, en tanto que las células control no lo hicieron. Leung *et al.* (1989) Science, supra.

Si bien se pudo aislar un factor de crecimiento de las células del endotelio vascular y purificar de fuentes naturales para su posterior uso terapéutico, las concentraciones relativamente bajas de la proteína en las células foliculares y el alto costo, tanto en términos de esfuerzo como de costo, de recuperación del VEGF demostró ser comercialmente infructuosa. En consecuencia, se iniciaron otros intentos para clonar y expresar el VEGF por medio de técnicas de ADN recombinante. (ver, *por ej.*, Ferrara, Laboratory Investigation 72:615–618 (1995) y las referencias citadas en dicho documento).

El VEGF se expresa en una variedad de tejidos en múltiples formas homodiméricas (121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos por monómero) como resultado del empalme alternativo del ARN. VEGF₁₂₁ es un mitógeno soluble que no se une a la heparina; las formas más largas del VEGF se unen a la heparina con afinidad progresivamente más alta. Las formas de unión a heparina del VEGF se pueden escindir en el término carboxi por la plasmina para liberar una o más formas difundibles del VEGF. La secuenciación de aminoácidos del péptido carboxi terminal identificado después de la escisión de la plasmina es Arg₁₁₀–Ala₁₁₁. La proteína de “núcleo” amino terminal, VEGF (1–110) aislada en forma de homodímero, se une a anticuerpos monoclonales neutralizantes (tales como los anticuerpos denominados 4.6.1 y 3.2E3.1.1) y formas solubles de receptores VEGF con similar afinidad en comparación con el homodímero intacto VEGF₁₆₅.

También se han identificado varias moléculas estructuralmente relacionadas con el VEGF, incluyendo el factor de crecimiento placentario (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). Se ha identificado un receptor de tirosina quinasa, Flt–4 (VEGFR–3), como receptor para VEGF–C y VEGF–D. Joukov *et al.* EMBO J. 15:1751(1996); Lee *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1988–1992(1996); Achen *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:548–553. Se ha

demostrado que VEGF-C está implicado 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 para tratar el cáncer ovárico incluyen cualquier anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se una con suficiente afinidad y especificidad al VEGF y que pueda reducir o inhibir la actividad biológica de VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF por lo general no se une a otros homólogos del 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 no a modo de limitación, un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709; un anticuerpo monoclonal anti-VEGF anticuerpo recombinante humanizado 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®”. AVASTIN® se comercializa en ciertos países. Comprende regiones de marco de IgG1 humana mutada y regiones determinantes de la complementariedad de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal murino anti-hVEGF A.4.6.1 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente 93% de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, incluyendo la mayor parte de las regiones de marco, deriva de la IgG1 humana y aproximadamente 7% de la secuencia deriva del anticuerpo murino A4.6.1.

El Bevacizumab y otros anticuerpos humanizados anti-VEGF han sido descritos con mayor detalle en la patente de Estados Unidos No. 6.884.879 concedida el 26 de Feb. de 2005. Otros anticuerpos incluyen los anticuerpos de la serie G6 o B20 (por ej., G6–31, B20–4.1), de acuerdo con lo descrito en la Publicación PCT No. WO2005/012359, La Publicación PCT No. WO2005/044853 y la solicitud de patente de E.E.U.U. 60/991.302; el contenido de estas solicitudes de patente se incorpora expresamente a la presente como referencia. Por más anticuerpos, remitirse a las Patentes de Estados Unidos Nos. 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020, 6.054.297, WO98/45332, WO 96/30046, WO94/10202, EP 0666868B1, Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126 y Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288:149–164

(2004). Otros anticuerpos incluyen los que se unen a un epítoto funcional del VEGF humano que comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104 o, por otro lado, 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 DVWGQGTLVT VSS (SEC ID No. 1)

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

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

Un “anticuerpo de la serie G6” de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo anti-VEGF que deriva de una secuencia de un anticuerpo G6 o anticuerpo derivado de G6 de acuerdo con cualquiera de las figuras 7, 24–26 y 34–35 de la publicación PCT No. WO2005/012359, la descripción completa de la cual se incorpora expresamente a la presente como referencia. Ver también la publicación PCT No. WO2005/044853, la descripción completa de la cual se incorpora expresamente a la presente como referencia. En una realización, el anticuerpo de la serie G6 se une a un epítoto funcional del VEGF humano que comprende los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

Un “anticuerpo de la serie B20” es, de acuerdo con la presente invención, un anticuerpo anti-VEGF que deriva de una secuencia del anticuerpo B20 o un anticuerpo derivado de B20 de acuerdo con cualquiera de las figuras 27–29 de la publicación PCT No. WO2005/012359, la descripción completa de la cual se incorpora expresamente a la presente como referencia. Ver también la publicación PCT No. WO2005/044853 y la solicitud de patente de E.E.U.U. 60/991.302; el contenido de estas solicitudes de patente se incorpora expresamente a la presente como referencia. En una realización, el anticuerpo de la serie B20 se une a un epítoto funcional del VEGF humano que comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104.

Un “epítoto funcional” de acuerdo con la presente invención se refiere a residuos aminoácidos de un antígeno que contribuyen enérgicamente a la unión

de un anticuerpo. La mutación de cualquiera de los residuos del antígeno que contribuyen enérgicamente, por ejemplo la mutación del VEGF de tipo salvaje por la mutación de alanina u homólogo) altera la unión del anticuerpo de tal manera que la relación de afinidad relativa (IC_{50} de VEGF mutante / IC_{50} de VEGF de tipo salvaje) del anticuerpo sea más de 5 (ver 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 en solución. En pocas palabras, se revisten inmunoplasacas Maxisorp de 96 pocillos (NUNC) de un día para otro a 4°C con una forma Fab del anticuerpo a analizar en una concentración de 2 µg/ml en PBS y se las bloquea con PBS, 0.5% BSA y Tween 20 al 0,05% (PBT) por espacio de 2h a temperatura ambiente. En primer lugar se incuban diluciones en serie de mutantes de punto de alanina del hVEGF con exhibición de fagos (forma de residuos 8–109) o hVEGF de tipo salvaje (8–109) en PBT en las placas revestidas con Fab por espacio de 15 min a temperatura ambiente y se lavan las placas con PBS, Tween 20 al 0,05% (PBST). Se detecta el fago unido con un conjugado anticuerpo monoclonal anti-M13 peroxidasa de rábano (Amersham Pharmacia) diluido 1:5000 en PBT, revelado con un sustrato de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) durante aproximadamente 5 min, se inactiva con H_3PO_4 1,0 M y se lee espectrofotométricamente a 450 nm. La relación de los valores IC_{50} ($IC_{50,ala}/IC_{50,wt}$) representa las veces de reducción de la afinidad de unión (la afinidad de unión relativa).

(iii) *Moléculas receptoras de VEGF*

Se han identificado dos receptores VEGF, Flt-1 (también denominado VEGFR-1) y KDR (también denominado VEGFR-2). Shibuya et al. (1990) Oncogene 8:519–527; de Vries et al. (1992) Science 255:989–991; Terman et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 187:1579–1586. La especificidad de cada receptor por cada miembro de la familia del VEGF varía, aunque VEGF-A se une tanto a Flt-1 como a KDR. Se ha demostrado que la neuropilina-1 es un receptor selectivo de VEGF, con capacidad para unirse a las isoformas de unión a heparina de VEGF (Soker et al. (1998) Cell 92:735–45). Tanto Flt-1 como KDR pertenecen a la familia de receptores tirosina quinasas (RTKs). Las RTKs comprenden una gran familia de receptores transmembrana con diversas actividades biológicas. En la actualidad, se han identificado por lo menos diecinueve (19) subfamilias de RTK diferenciadas. La familia de receptores de tirosina quinasa (RTK) incluye receptores que son cruciales para el crecimiento y diferenciación de una variedad de tipos de células (Yarden y Ullrich (1988) Ann.

Rev. Biochem. 57:433–478; Ullrich y Schlessinger (1990) Cell 61:243–254). La función intrínseca de las RTKs se activa tras la unión del ligando, lo que da lugar a la fosforilación del receptor y múltiples sustratos celulares y seguidamente en una variedad de respuestas celulares (Ullrich & Schlessinger (1990) Cell 61:203–212). De esa manera, la transducción de la señal mediada por el receptor de tirosina quinasa es iniciada por la interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando), seguida típicamente por la dimerización del receptor, la estimulación de la actividad intrínseca de la proteína tirosina quinasa y la transfosforilación del receptor. De esa manera se generan sitios de unión para las moléculas de transducción de señal intracelular y llevan a la formación de complejos con un espectro de moléculas de señalización citoplasmática que facilitan la respuesta celular apropiada (por ej., la división, diferenciación celular, efectos metabólicos, cambios del microambiente extracelular). Ver Schlessinger y Ullrich (1992) Neuron 9:1–20. Estructuralmente, tanto Flt-1 como KDR tienen siete dominios tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular, una única región transmembrana y una secuencia consenso de tirosina quinasa que está interrumpida por un dominio de inerción de quinasa. Matthews et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9026–9030; Terman et al. (1991) Oncogene 6:1677–1683.

Se pueden utilizar moléculas receptoras de VEGF o fragmentos de las mismas, que se unen específicamente a VEGF en los métodos de la invención para unirse y secuestrar la proteína VEGF, impidiendo así su señalización. En ciertas realizaciones, la molécula receptora de VEGF o fragmento de unión a VEGF del mismo, es una forma soluble tal como sFlt-1. Una forma soluble del receptor ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad biológica de la proteína VEGF por la unión a VEGF, impidiendo así que se una a sus receptores naturales presentes en la superficie de las células objetivo. También se incluyen las proteínas de fusión del receptor VEGF, ejemplos de las cuales se describen a continuación.

Una proteína receptora quimérica de VEGF 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 tiene capacidad para unirse e inhibir la actividad biológica del VEGF. En ciertas realizaciones, las proteínas quiméricas receptoras de VEGFs de la invención consisten en las secuencias de aminoácidos derivadas de sólo dos moléculas receptoras de VEGF diferentes; sin embargo, puede haber secuencias de aminoácidos que comprenden uno, dos, tres, cuatro,

cinco, seis o los siete dominios símil Ig de la región extracelular de unión al ligando del receptor flt-1 y/o KDR ligadas a secuencias de aminoácidos de otras proteínas no relacionadas, por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina. Otras secuencias de aminoácidos con las cuales se combinan los dominios tipo Ig han de ser obvias para la persona con capacitación en la técnica. Entre los ejemplos de proteínas receptoras quiméricas de VEGF se cuentan, por ej., Flt-1/Fc, KDR/Fc o FLT-1/KDR/Fc solubles (también conocidas como Trampa de VEGF). (ver por ejemplo la Publicación de solicitud PCT No. WO97/44453)

Una proteína soluble receptora de VEGF o las proteínas receptoras quiméricas de VEGF de la invención incluye proteínas receptoras de VEGF que no están fijadas a la superficie de las células por medio de un dominio transmembrana. Por tal motivo, las formas solubles del receptor de VEGF, incluyendo proteínas receptoras quiméricas, aunque tiene capacidad para unirse e inactivar el VEGF, no comprenden un dominio transmembrana y, por consiguiente, en general no se asocian a la membrana celular de las células en las cuales se expresa la molécula.

III. USOS TERAPÉUTICOS DE LOS ANTICUERPOS Anti-VEGF

La invención abarca la terapia antiangiogénica, una novedosa estrategia de tratamiento del cáncer que apunta a inhibir el desarrollo de los vasos sanguíneos tumorales necesarios para aportar nutrientes para sostener el desarrollo de los tumores. Dado que la angiogénesis está implicada tanto en el desarrollo de tumores primarios como en las metástasis, el tratamiento antiangiogénico provisto por la invención tiene la capacidad de inhibir el desarrollo neoplásico del tumor en el sitio primario, como así también de prevenir las metástasis de los tumores en los sitios secundarios, y por lo tanto permite el ataque de los tumores por otras terapias. Además, el cáncer ovárico está asociado a un alto nivel de circulación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una proteína asociada al desarrollo y propagación de tumores. Los estudios de mujeres con cáncer ovárico han arrojado una correlación entre un alto nivel de VEGF y un pronóstico más desfavorable (Alvarez A et al. 1999 Clin Cancer Res.; 5:587-591; Yamamoto S et al. 1997 Br J Cancer; 76:1221-1227).

Específicamente, en una realización, la invención presenta un método para tratar un paciente con diagnóstico (opcionalmente diagnóstico reciente), de cáncer ovárico sin tratamiento anterior, que comprende someter a la paciente a un régimen de tratamiento que combina por lo menos quimioterapia concomitante con

la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En ciertas realizaciones de la invención, la paciente tiene cáncer ovárico peritoneal primario o de trompas de falopio en estadio III (con citorreducción subóptima y macroscópica óptima) o estadio IV. En otras realizaciones, la paciente tiene cáncer epitelial ovárico, de trompas de falopio o peritoneal primario en estadio I y IIa (Grado 3 o carcinoma de células claras solamente) o en estadio IIb – IV. En otra realización, la invención presenta un método de tratamiento de una paciente con diagnóstico de cáncer ovárico recurrente o con tratamiento anterior, que comprende someter a la paciente a un régimen de tratamiento que combina por lo menos quimioterapia concomitante con la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.

Terapias Combinatorias

La invención presenta el uso de una combinación de por lo menos un antagonista específico de VEGF con una o más terapias anticancerosas adicionales seguidas por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. Los ejemplos de terapias contra el cáncer incluyen, aunque no a modo de limitación, cirugía, terapia radiante (radioterapia), bioterapia, inmunoterapia, quimioterapia o una combinación de estas terapias. Además, se pueden utilizar agentes citotóxicos, agentes anti-angiogénicos y agentes antiproliferativos en combinación con el antagonista específico del VEGF.

In certain aspects, la invención presenta un método de tratamiento del cáncer ovárico, mediante la administración de cantidades efectivas de un anticuerpo anti-VEGF y uno o más agentes quimioterapéuticos a una paciente susceptible de ser diagnosticada o diagnosticada con cáncer ovárico sin tratamiento anterior o cáncer ovárico recurrente. Se puede utilizar una variedad de agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinados de la invención. En la presente se ofrece una lista ilustrativa y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados bajo "Definición" o descriptos en esta solicitud.

En un ejemplo, la invención presenta el uso de un antagonista específico de VEGF con uno o más agentes quimioterapéuticos (por ej., un cocktail) o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es por ejemplo, taxano, paclitaxel, docetaxel, partículas unidas a la proteína de paclitaxel (por ej., Abraxane®), análogos de platino, carboplatino, gemcitabina o combinaciones de esas terapias. En una realización, los agentes quimioterapéuticos son carboplatino y paclitaxel o docetaxel. En otra realización,

los agentes quimioterapéuticos son carboplatino y gemcitabina. La administración combinada incluye la administración simultánea, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, o bien la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferentemente hay un período de tiempo en que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas seguidas por terapia de mantenimiento con un antagonista específico de VEGF, por ej., de acuerdo con lo esbozado en la figura 1, la figura 2 o la figura 8 o la figura 11. La preparación y esquemas de dosificación de dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes o según la determinación empírica del profesional capacitado. La preparación y esquemas de dosificación de la quimioterapia también han sido descritos en Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del antagonista específico del VEGF o se lo puede administrar simultáneamente con el mismo. En ciertas realizaciones de la invención, los esquemas de dosificación y cantidades están consignados en la figura 1, la figura 2 o la figura 8 o la figura 11.

En algunos aspectos adicionales, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia combinatoria de tumores con el anticuerpo de la invención incluyen antagonistas de otros factores que están implicados en el desarrollo de tumores, tales como EGFR, ErbB2 (también conocidos como Her2) ErbB3, ErbB4 o TNF. En ocasiones, puede ser ventajoso administrar asimismo una más citoquinas a la paciente. En una realización, el anticuerpo VEGF es coadministrado con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede ser administrado en primer lugar, seguido por el anticuerpo para VEGF. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del anticuerpo para VEGF en primer lugar. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son las utilizadas actualmente y se las puede reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo anti-VEGF.

La formulación de la presente también puede contener más de un compuesto activo como necesario para la indicación específica en tratamiento, preferentemente aquellos que tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser conveniente administrar además anticuerpos que se unan a EGFR, VEGF (por ej. un anticuerpo que se

une a un epítoto diferente de VEGF), VEGFR, ErbB2 (por ej., Herceptin®) u otro anticuerpo utilizado en indicaciones oncológicas en la formulación. Por otro lado o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de VEGFR de pequeñas moléculas. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades efectivas para el propósito pretendido. En ciertas realizaciones, el antagonista del VEGF (por ej., el anticuerpo anti-VEGF) es el tratamiento para el cáncer ovárico. En ciertas realizaciones, el antagonistas de VEGF (por ej., el anticuerpo anti-VEGF) se combina con carboplatino y paclitaxel seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En ciertas realizaciones, se combina el antagonista de VEGF (por ej., el anticuerpo anti-VEGF) con cisplatino y paclitaxel seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En ciertas realizaciones, se combina el antagonista del VEGF (por ej., el anticuerpo anti-VEGF) con carboplatino y docetaxel seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En ciertas realizaciones, se combina el antagonista del VEGF (por ej., el anticuerpo anti-VEGF) con carboplatino y gemcitabina seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.

En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia combinatoria contra el cáncer con el anticuerpo de la invención incluyen otros agentes anti-angiogénicos. Se han identificado muchos antes antiangiogénicos y son conocidos en la técnica, incluyendo los enumerados por Carmeliet y Jain (2000). En una realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se utiliza en combinación con otros antagonistas del VEGF o un antagonista del receptor de VEGF tal como variantes de VEGF, fragmentos solubles del receptor VEGF, aptámeros con capacidad para bloquear el VEGF o VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR neutralizantes, inhibidores de bajo peso molecular de las VEGFR tirosina quinasas y cualquier combinación de los mismos. Por otro lado o además, se pueden coadministrar dos o más anticuerpos anti-VEGF a la paciente.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada del antagonista específico de VEGF depende del tipo de enfermedad a tratar, de acuerdo con lo definido anteriormente, de la severidad y el curso de la enfermedad, de si el antagonista específico del VEGF se administra con fines preventivos o terapéuticos, de terapias anteriores, de la historia clínica de la paciente y de la respuesta al antagonista específico del VEGF y el criterio del médico a cargo. El antagonista específico del VEGF se administra adecuadamente

a la paciente de una vez o en una serie de tratamientos. En un régimen de terapia combinatoria, se administra el antagonista específico del VEGF y dicho uno o más agentes terapéuticos anticancerosos de acuerdo con la presente invención en una cantidad terapéuticamente efectiva o sinérgica. En el presente contexto, una cantidad terapéuticamente efectiva es tal que la administración conjunta de un antagonista específico de VEGF y uno o más agentes terapéuticos adicionales o la administración de una composición de la invención, dé lugar a una reducción o inhibición del cáncer de acuerdo con lo descrito anteriormente. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es la cantidad de un antagonista específico de VEGF y uno o más agentes terapéuticos adicionales necesaria para reducir de manera sinérgica o significativa, o eliminar, las condiciones o síntomas asociados a una enfermedad específica o para aumentar la sobrevida sin progreso.

El antagonista específico del VEGF y dicho uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar en forma simultánea o sucesiva en una cantidad y durante un lapso suficiente para reducir o eliminar la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor latente o una micrometástasis. El antagonista específico del VEGF se puede administrar como terapia de mantenimiento para prevenir o reducir la probabilidad de recurrencia del tumor o para aumentar la sobrevida sin progreso de la paciente.

Como comprenderán las personas con capacitación en la técnica, las dosis apropiadas de los agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticancerosos están generalmente alrededor de las ya empleadas en terapias clínicas, por ej., donde se administran los agentes quimioterapéuticos solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Es probable que la variación de la dosificación tenga lugar dependiendo de la condición en tratamiento. El médico que administra el tratamiento podrá determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Además de los regímenes terapéuticos antes mencionados, se puede someter a la paciente a terapia radiante.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo VEGF administrado es un anticuerpo intacto, desnudo. Sin embargo, el anticuerpo VEGF puede estar conjugado a un agente citotóxico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo conjugado y/o antígeno al cual éste se une es/son internalizados por la célula, para dar lugar a una eficacia terapéutica incrementada del conjugado para matar la célula cancerosa a la cual se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige o interfiere con un ácido nucleico en la célula cancerosa. Entre los ejemplos de dichos agentes citotóxicos se incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

La invención presenta asimismo un método para instruir a un sujeto humano con cáncer ovárico ofreciéndole instrucciones para recibir tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF a fin de aumentar la duración de la sobrevida sin progreso, reducir el riesgo del sujeto de recurrencia del cáncer o aumentar las probabilidades de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones el método comprende además ofrecer instrucciones para recibir tratamiento con por lo menos un agente quimioterapéutico seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En algunas realizaciones el método comprende además ofrecer instrucciones para recibir tratamiento con dos o más agentes quimioterapéuticos seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF puede ser concomitante con el tratamiento con el o los agentes quimioterapéuticos. En ciertas realizaciones se trata al sujeto de acuerdo con lo indicado por el método de instrucción. El tratamiento del cáncer ovárico mediante la administración de un anticuerpo anti-VEGF con o sin quimioterapia puede continuar hasta la recurrencia del cáncer o la muerte. En ciertas realizaciones de la invención, se trata a la paciente con por lo menos 16 ciclos de terapia anti-VEGF después de la terapia concomitante con uno o más agentes quimioterapéuticos. En otras realizaciones de la invención, se trata a la paciente con por lo menos 12 ciclos de terapia anti-VEGF después de la terapia concomitante con uno o más agentes quimioterapéuticos.

La invención presenta además un método de promoción que comprende promover la administración de un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento del cáncer ovárico en una sujeto humana. En algunas realizaciones el método comprende además promover la administración de por lo menos un agente quimioterapéutico seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En algunas realizaciones el método comprende además promover la administración de dos o más agentes quimioterapéuticos seguida por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. La administración del anticuerpo anti-VEGF puede ser concomitante con la administración del agente o agentes quimioterapéuticos. La promoción se puede llevar a cabo por cualquier medio disponible. En algunas realizaciones la promoción es un prospecto que acompaña a una formulación comercial del anticuerpo anti-VEGF. La promoción puede consistir asimismo en un prospecto que acompaña a una formulación comercial del agente o agentes quimioterapéuticos. La promoción se puede realizar por comunicación escrita u oral a un médico o profesional de atención de la salud. En algunas realizaciones la promoción se realiza por medio de un prospecto, donde el prospecto presenta

instrucciones para recibir terapia contra el cáncer ovárico con el anticuerpo anti-VEGF. En una realización adicional, el prospecto incluya parte o la totalidad de los resultados expuestos en el Ejemplo 1 o el Ejemplo 2 o el Ejemplo 3. En algunas realizaciones, a la promoción sigue el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con o sin el o los agentes quimioterapéuticos.

La invención da a conocer un método comercial, que comprende la comercialización de un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento del cáncer ovárico en una sujeto humana con el fin de aumentar el tiempo de sobrevida sin progreso de la sujeto, para reducir las probabilidades de recurrencia del cáncer de la sujeto o aumentar las probabilidades de supervivencia de la sujeto. En algunas realizaciones el método comprende además la comercialización de un agente quimioterapéutico para usar en combinación con el anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En algunas realizaciones a la comercialización sigue el tratamiento de la sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con o sin el agente quimioterapéutico seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En algunas realizaciones el método comprende además la comercialización de dos o más agentes quimioterapéuticos para usar en combinación con el anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. En algunas realizaciones a la comercialización sigue el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con o sin el agente quimioterapéuticos seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.

Se presenta asimismo un método comercial, que comprende la comercialización de un agente quimioterapéutico en combinación con un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento de cáncer ovárico en una sujeto humana con el propósito de aumentar el tiempo de sobrevida sin progreso de la sujeto, para reducir las probabilidades de recurrencia del cáncer del sujeto o aumentar las probabilidades de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones a la comercialización sigue el tratamiento del sujeto con la combinación del agente quimioterapéutico y el anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. También se presenta un método comercial, que comprende la comercialización de dos o más agentes quimioterapéuticos en combinación con un anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF para el tratamiento de cáncer ovárico en una sujeto humana con el propósito de aumentar el tiempo de sobrevida sin progreso de la sujeto, para reducir las probabilidades de recurrencia del cáncer del sujeto o aumentar las probabilidades de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones a la

comercialización sigue el tratamiento del sujeto con la combinación del agente quimioterapéuticos y el anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.

IV DOSIS Y DURACIÓN

La composición del antagonista específico del VEGF se ha de formular, dosificar y administrar de manera compatible con la práctica médica correcta. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno específico a tratar, el sujeto específico en tratamiento, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno específico en tratamiento, 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 efectiva” del antagonista específico del VEGF a administrar está gobernada por esos factores y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mitigar o tratar o estabilizar el cáncer; para aumentar el tiempo hasta el progreso (duración de la sobrevida sin progreso) o para tratar o prevenir la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor latente o una micrometástasis. El antagonista específico del VEGF no es necesariamente, pero sí opcionalmente, formulado con uno o más agentes utilizados de manera concomitante para prevenir o tratar el cáncer o el riesgo de desarrollar un cáncer. La cantidad efectiva de dichos agentes adicionales depende de la cantidad del antagonista específico de VEGF presente en la formulación, del tipo de trastorno o del tratamiento y otros factores mencionados anteriormente. Estos se utilizan, por lo general, en las mismas dosis y vías de administración utilizadas en el marco de la presente o aproximadamente de 1 a 99% de las dosis empleadas hasta ahora.

Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ej., 0,1–20 mg/kg) del antagonista específico de VEGF es una dosis posible inicial para la administración a la paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría estar en el rango de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores antes mencionados. Las dosis especialmente ventajosas incluyen, por ejemplo, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg. En el caso de las administraciones repetidas en el curso de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostiene hasta el tratamiento del cáncer, medido por los métodos antes descriptos o conocidos en la técnica. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden

ser útiles. En un ejemplo, si el antagonista específico del VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo de la invención se administra una vez por semana, cada dos semanas o cada tres semanas, en un rango de dosificación de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo, aunque no a modo de limitación, 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 por técnicas y ensayos convencionales. En otras realizaciones, dicho régimen de dosificación se utiliza en combinación con un régimen de quimioterapia regimen (incluyendo, aunque no a modo de limitación, uno o más agentes quimioterapéuticos como terapia de primera línea para el tratamiento del cáncer ovárico sin tratamiento anterior seguido por terapia de mantenimiento. En otras realizaciones, dicho régimen de dosificación se utiliza en combinación con un régimen de quimioterapia (incluyendo, aunque no a modo de limitación, uno o más agentes quimioterapéuticos) como terapia de segunda línea para tratar el cáncer ovárico recurrente seguido por terapia de mantenimiento. Se presenta más información sobre dosis aproximadamente adecuadas en los siguientes Ejemplos.

La duración de terapia will continue for as long as medically indicated or until a desired therapeutic effect (por ej., those described herein) is achieved. En ciertas realizaciones, el antagonista específico del VEGF terapia is continued for 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o for a period of años up to the lifetime of the subject. En ciertas realizaciones, the terapia anti-VEGF is continued for por lo menos 16 ciclos after the concurrent anti-VEGF treatment with agentes quimioterapéuticos. En otras realizaciones, the terapia anti-VEGF is continued for por lo menos 12 ciclos after the concurrent anti-VEGF treatment with agentes quimioterapéuticos.

Los antagonistas específicos del VEGF de la invención son administrados a un sujeto, por ej., una paciente humana, de acuerdo con con métodos conocidos tales como por administración endovenosa en forma de bolo o por infusión continua en el curso de un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. La administración local es particularmente conveniente si hay extensos efectos secundarios o toxicidad asociados con el antagonismo del VEGF. También se puede utilizar una estrategia ex vivo para aplicaciones terapéuticos. Las estrategias ex vivo conllevan la transfección o transducción de las células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un antagonista del VEGF. A continuación se restituyen a la sujeto las células

transfectadas o transducidas. Las células pueden ser de cualquiera de un amplio rango de tipos entre los que se incluyen, aunque no a modo de 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 del VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo es administrado por cualquier medio adecuado, incluyendo por vía parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si resulta conveniente para el tratamiento inmunosupresor, por administración intralesión. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, endovenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo es administrado adecuadamente por infusión de pulsos, especialmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación es administrada por inyecciones, muy preferentemente inyecciones endovenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

En otro ejemplo, el compuesto antagonista específico del VEGF es administrado por vía local, por ej., mediante inyecciones directas, cuando el trastorno o ubicación del tumor permite y las inyecciones se pueden repetir periódicamente. El antagonista específico del VEGF también se puede administrar por vía sistémica al sujeto o directamente a las células tumorales, por ej., a un tumor o un lecho tumoral después de la extirpación quirúrgica del tumor, a fin de prevenir o reducir la recurrencia local o metástasis, por ejemplo de un tumor latente o micrometástasis.

Por otro lado, se puede administrar una molécula de ácido nucleico inhibitoria o un polinucleótido que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un antagonista específico de VEGF a las células apropiadas en el sujeto. En ciertas realizaciones, se puede dirigir el ácido nucleico al tumor en sí.

Se puede introducir un ácido nucleico en las células por cualquier medio apropiado para el vector empleado. Muchos de esos métodos son muy conocidos en la técnica (Sambrook et al., *supra* y Watson et al., Recombinant DNA, Chapter 12, 2ª edición, Scientific American Books, 1992). Entre los ejemplos de métodos de administración génica se cuentan la transfección mediada por liposomas, electroporación, fosfato de calcio/ DEAE dextrano, pistola de genes y microinyección.

V. FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones terapéuticas de un anticuerpo de acuerdo con la invención se preparan para el almacenamiento mezclando el anticuerpo, que tiene un grado de pureza conveniente, con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables, (Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen buffers tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina, conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (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, mannososa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA, azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio, complejos de metal (por ej., complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones preferidas liofilizadas del anticuerpo anti-VEGF han sido descritas en WO 97/04801, que se incorpora expresamente a la presente como referencia.

Opcionalmente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, por lo general, por ej., cloruro de sodio y preferentemente en concentraciones aproximadamente fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la concentración de conservante está en el rango de 0,1 a 2,0%, generalmente v/v.

Suitable preservatives include those known in the pharmaceutical arts. Benzyl alcohol, phenol, m-cresol, methylparaben y propylparaben are ejemplos of preservatives. Optionally, the formulations de la invención can include a pharmaceutically acceptable surfactant at a concentration of 0.005 to 0.02%. Por lo general se aplica bevacizumab para uso terapéutico en frascos ampolla para un

solo uso sin conservantes de 100 mg y 400 mg para administrar 4 ml o 16 ml de bevacizumab (25 mg/ml). El producto de 100 mg se formula en 240 mg de α , α -trehalose deshidratada, 23,2 mg de fosfato de sodio (monobásico, monohidrato), 4,8 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhidro), 1,6 mg de polisorbato 20 y agua para inyección, USP. El producto de 400 mg se formula en 960 mg de α , α -trehalose deshidratada, 92,8 mg de fosfato de sodio (monobásico, monohidrato), 19,2 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhidro), 6,4 mg de polisorbato 20 y Agua para inyección, USP. Ver también el rótulo del bevacizumab.

La formulación de la presente puede comprender asimismo más de un compuesto activo que sea necesario para la indicación específica en tratamiento, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser conveniente incluir también anticuerpos que se unen a EGFR, VEGF (*por ej.* un anticuerpo que se una a un epítipo diferente de VEGF), VEGFR o ErbB2 (*por ej.*, Herceptin®) en la formulación única. Por otro lado o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento y/o un antagonista de VEGFR de pequeñas moléculas. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades efectivas para el fin pretendido.

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

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se cuentan matrices semipermeables de polímero hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos formados, *por ej.*, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se cuentan los poliésteres, hidrogeles (*por ejemplo*, poli(2-hidroxietil-methacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de los Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etileno-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como

el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(–)-3-hidroxibutírico.

Si bien los polímeros tales como etileno-vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de las moléculas en el curso de más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un período prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando lugar a la pérdida de actividad biológica y a posibles cambios de la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo en cuestión. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces intermoleculares S–S por medio de intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

VI EFICACIA DEL TRATAMIENTO

La principal ventaja del tratamiento de la invención es la capacidad para producir pronunciados efectos anticancerosos en un paciente humano sin causar toxicidad significativa ni efectos adversos, de manera que el paciente se beneficie del tratamiento en su conjunto. La eficacia del tratamiento de acuerdo con la invención se puede medir mediante diversos puntos finales utilizados comúnmente en la evaluación de los tratamientos para el cáncer, incluyendo, aunque no a modo de limitación, la regresión de los tumores, el encogimiento del peso o tamaño de los tumores, el tiempo transcurrido hasta el progreso, la duración de la sobrevida, la sobrevida sin progreso, la tasa de respuesta general, la duración de la respuesta y la calidad de vida. Dado que los agentes antiangiogénicos de la invención se dirigen a la vasculatura tumoral y no necesariamente a las células neoplásicas en sí, representan una clase singular de drogas contra el cáncer y, por lo tanto, se pueden emplear medidas y definiciones de respuestas clínicas a las drogas singulares. Por ejemplo, una retracción del tumor de más de 50% en un análisis bidimensional es el corte normal para declarar una respuesta. Sin embargo, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede causar la inhibición de la

propagación de metástasis sin retracción del tumor primario o puede simplemente ejercer un efecto tumoristático. En consecuencia, opcionalmente se emplean otras estrategias para determinar la eficacia de una terapia anti-angiogénica, incluyendo por ejemplo, la medición de marcadores plasmáticos o urinarios de angiogénesis y la medición de la respuesta por medio de imágenes radiológicas.

En otra realización, la invención presenta métodos para prolongar la sobrevida sin progreso de un paciente humano susceptible o con diagnóstico de cáncer. El tiempo transcurrido hasta el progreso de la enfermedad se define como el tiempo transcurrido desde la administración de la droga hasta el progreso de la enfermedad o la muerte. En una realización preferida, el tratamiento combinatorio de la invención que utiliza el anticuerpo anti-VEGF y uno o más agentes quimioterapéuticos seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF prolonga significativamente la sobrevida sin progreso por lo menos aproximadamente 1 mes, 2 meses, 2,3 meses, 2,9 meses, 3,0 meses, 3,8 meses, preferentemente aproximadamente 1 a aproximadamente 6,1 meses, en comparación con un tratamiento sin terapia de mantenimiento con el anticuerpo anti-VEGF. En una realización, la mediana de PFS en meses (95% CI) se incrementa 3,8 meses (0,717 (0,625, 0,824) con un valor p de una vía (rango logarítmico) de <0,001)) en las pacientes tratadas con bevacizumab y terapia de taxano (por ej., docetaxel o paclitaxel) y carboplatino seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF en comparación con el control. En otra realización, la diferencia en la mediana de PFS en meses (95% CI) entre las pacientes que reciben paclitaxel y carboplatino solamente contra paclitaxel, carboplatino y anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF es de 2,3 meses con una HR=0,79 y un valor p (Prueba de Rango Logarítmico) de 0,0010.

VII Producción de Anticuerpos

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se cultivan preferentemente en animales mediante inyecciones múltiples por vía subcutánea (sc) o intraperitoneal (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser ventajoso conjutar el antígeno relevante a una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, *por ej.*, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo, éster de maleimidobenzoyl sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (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 inmunogénicos o derivados mediante la combinación, *por ej.*, de 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (en el caso de conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Al cabo de un mes se da a los animales un refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días más tarde se extrae sangre de los animales y se analiza el suero para determinar el título de anticuerpos. Se dan refuerzos a los animales hasta que el título alcance una meseta. De preferencia, se da al animal un refuerzo del conjugado con el mismo antígeno, aunque conjugado a una proteína diferente y/o por medio de un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los conjugados también se pueden preparar en cultivo de células recombinantes como fusiones proteicas. Además, se utilizan convenientemente agentes de agregación tales como alumbre para realzar la respuesta inmune.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

En la técnica se dispone de diversos métodos para preparar los anticuerpos monoclonales de la presente. Por ejemplo, los anticuerpo monoclonales se pueden preparar empleando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., 1975, Nature, 256: 495, o se los puede preparar por métodos de ADN recombinante (por ejemplo, patente de E.E.U.U. No. 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o un mono macaco, de la manera antes descrita para provocar linfocitos que producen o tienen capacidad para producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína empleada para la inmunización. Por otro lado, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. A continuación se fusionan los linfocitos 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, pp.59–103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas son sembradas y cultivadas en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene 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 ha de incluir típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células con deficiencia de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan con eficiencia, sostienen un alto nivel de producción estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA y células SP-2 o X63-Ag8-653 existentes en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual se están desarrollando las células de hibridoma es analizado para detectar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, como por ejemplo radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Una vez identificadas las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad pretendida, se pueden subclonar los clones mediante procedimientos de dilución limitantes y cultivarlos por métodos standard (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, el medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar in vivo como tumores ascíticos en un animal.

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

Se aísla fácilmente el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales utilizando procedimientos convencionales (por ej., utilizando sondas oligonucleotídicas con capacidad para unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, se puede colocar el ADN en vectores de expresión que luego son transfectados en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. A continuación se describe en forma más detallada la producción recombinante de anticuerpos.

En una realización adicional, se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de bibliotecas de fagos de anticuerpos generados utilizando las técnicas descritas por 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, utilizando bibliotecas de fagos. Las publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango de nM) mediante transposición de cadena (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779–783 (1992)), como así también infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos de gran tamaño (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21:2265–2266 (1993)). Por consiguiente, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también se modifica, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificadora para los dominios constantes humanos de cadena pesada y liviana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de E.E.U.U. No. 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)) o mediante la unión covalente de la secuencia codificadora de inmunoglobulina a toda o parte de la secuencia codificadora para un polipéptido no inmunoglobulina.

Por lo general, dichos polipéptidos que no son de inmunoglobulina son sustituidos respecto de los dominios constantes de un anticuerpo o son sustituidos con respecto a los dominios variables de un sitio de combinación con el antígeno de un anticuerpo para generar un anticuerpo quimérico bivalente que comprende un sitio de combinación con el antígeno con especificidad por un antígeno y otro

sitio de combinación con el antígeno con especificidad por un antígeno diferente.

(iii) *Anticuerpos Humanizados y humanos*

Un anticuerpo humanizado presenta la introducción de uno o más residuos aminoácidos de una fuente que no es humana. Con frecuencia se hace referencia a estos residuos aminoácidos no humanos como residuos “de importación”, que se toman típicamente de un dominio variable “de importación”. La humanización se puede ejecutar 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 por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Patente de E.E.U.U. No. 4.816.567) en los cuales se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales los residuos de las CDR y, posiblemente, algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto liviano como pesado, a utilizar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método del “mejor ajuste”, se analiza la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor contra la biblioteca completa de secuencias humanas conocidas de dominio variable. Luego se acepta la secuencia humana que más se acerca a la del roedor como marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro método utiliza un marco específico derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo determinado de cadenas livianas y pesadas. Se puede utilizar el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

También es importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar esta meta, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas.

Normalmente hay modelos tridimensionales de inmunoglobulina disponibles y éstos son conocidos por las personas con capacitación en la técnica. Se dispone de programas de computación que ilustran y despliegan probables estructuras conformacionales tridimensionales de las secuencias de inmunoglobulina propuestas. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del posible rol de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina en cuestión, es *decir*, el análisis de los residuos que incluyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina propuesta para unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar los residuos de FR y combinar con las secuencias receptoras y de importación de manera de obtener la característica pretendida del anticuerpo, como ser su afinidad incrementada por el o los antígenos objetivo. En general, los residuos de las CDR están directamente y muy sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

Los anticuerpos humanizados anti-VEGF y las variantes con afinidad madurada de los mismos han sido descriptos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 6.884.879 presentada el 26 de febrero de 2005.

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ej., ratones) con capacidad, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descripto que la delección homocigota del gen de la región de junta de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de una matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea gereminal da lugar a la producción de anticuerpos humanos tras el desafío con el 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.*, Año in Immuno., 7:33 (1993) y Duchosal *et al.* Nature 355:258 (1992).

Por otro lado, se puede utilizar la 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, se clonan genes de dominio V de anticuerpos en marco en un gen de proteína de envoltura mayor o menor de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd y se exhiben como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fgo. Dado que la prtícula filamentosa contiene una copia de ADN

monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. De esa manera, el fago imita alguna de las propiedades de la célula B. La exhibición de fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para obtener una reseña véase, *por ej.*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564–571 (1993). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos de genes V para la exhibición de fagos. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624–628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña genoteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una diversa gama de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581–597 (1991) o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725–734 (1993). Ver, asimismo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

Como se señalara anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vitro* (ver las Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275). Se han descrito anticuerpos anti-VEGF monoclonales humanos en la patente de E.E.U.U. No. 5.730.977, concedida el 24 de marzo de 1998.

(iv) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos eran derivados mediante 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, ahora se pueden producir estos fragmentos directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo. Por otro lado, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarlos químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163–167 (1992)). De acuerdo con otra estrategia, se pueden aislar fragmentos F(ab')₂ directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos han de ser evidentes para el técnico capacitado. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Ver WO 93/16185.

(vi) *Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos*

Está contemplada la modificación (o modificaciones) de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se efectúa cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características pretendidas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraducción del anticuerpo, como ser el cambio del número o posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido con alanina" según lo descrito por Cunningham y Wells Science, 244:1081–1085 (1989). En este caso, se identifica un residuo o grupo de residuos objetivo (por ej., residuos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se los reemplaza con un aminoácido de carga neutra o negativa (muy preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan luego introduciendo otras o diferentes variantes en o para los sitios de sustitución. Por consiguiente, si bien el sitio para la introducción de una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario determinar la mutación per se. Por ejemplo, para analizar la eficiencia de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo la mutagénesis por barrido con ala o aleatoria en el codón o región objetivo y se seleccionan las inmunoglobulinas expresadas para la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxil-terminales cuya longitud está en el rango de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, como así también inserciones intrasecuencia de residuos aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes por inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión al término N- o C- del anticuerpo a

una enzima (por ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

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

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, en conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el grueso de la cadena secundaria.

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las similitudes de las propiedades de sus cadenas secundarias (según A. L. Lehninger, in Biochemistry, segunda ed., pp. 73–75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) non polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares sin carga: 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)

Por otro lado, los residuos de origen natural se pueden dividir en grupos sobre la base de las propiedades comunes de las cadenas secundarias:

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

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

También se puede sustituir cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en mantener la conformación correcta del anticuerpo, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir el entrecruzamiento aberrante. A la inversa, se pueden agregar enlaces de cisteína

al anticuerpo para mejorar su estabilidad (especialmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo especialmente preferido de variante por sustitución conlleva la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo progenitor (por ej., un anticuerpo humanizado o humano). Por lo general, la variante (o variantes) obtenidas para el posterior desarrollo tiene propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo progenitor del cual se los genera. Una manera conveniente de generar dichas variantes por sustitución conlleva la maduración de la afinidad utilizando exhibición de fagos. En pocas palabras, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ej., 6–7 sitios) para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Los anticuerpos variantes así generados se exhiben en forma monovalente en partículas de fago filamentoso en forma de fusiones al producto génico III de M13 empacado en cada partícula. Las variantes exhibidas en fagos son sometidas entonces a análisis de selección para determinar la actividad biológica (por ej., afinidad de unión) como se describe aquí. Para identificar los sitios propuestos de la región hipervariable para la modificación, se puede realizar la mutagénesis por barrido con alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Por otro lado, o además, puede ser ventajoso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno–anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el VEGF humano. Dichos residuos de contacto y residuos anexos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente. Una vez generadas dichas variantes, se somete al panel de variantes a análisis de selección de acuerdo con lo descrito en la presente y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para su posterior desarrollo.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón original de glicosilación del anticuerpo. Alteración se refiere a la delección de uno o más restos carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de los anticuerpos está por lo general ligada por N o ligada por O. Ligada por N se refiere al acoplamiento del resto carbohidrato a la cadena secundaria de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina–X–serina y asparagina–X–treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento enzimático del

resto carbohidrato a la cadena secundaria de asparagina. Por consiguiente, la presencia de uno cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido genera un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada por O se refiere al acoplamiento de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, muy comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de la secuencias de tripéptidos antes descritas (en el caso de los sitios de glicosilación N-ligados). La alteración se puede realizar asimismo mediante la adición, o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (en el caso de los sitios de glicosilación O-ligados).

En los casos en que el anticuerpo comprende una Región Fc, se puede alterar el carbohidrato acoplado a la misma. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa acoplada a una Región Fc del anticuerpo en la solicitud de patente de los Estados Unidos 2003/0157108 Presta, L. Véase asimismo US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se hace referencia a los anticuerpos con N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectriz en el carbohidrato acoplado a una Región Fc del anticuerpo en WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y en la Patente de Estados Unidos No. 6.602.684, Umana et al. Se dieron a conocer anticuerpos con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido acoplado a una Región Fc del anticuerpo en WO 1997/30087, Patel et al. Véase, además, WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) en lo que respecta a anticuerpos con carbohidratos modificados acoplados a la Región Fc de los mismos.

Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, *por ej.* a fin de potenciar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Por otro lado, o además, se puede introducir uno o más residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces de disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad mejorada de internalización y/o matanza de células mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) mejoradas (ADCC). Ver Caron *et al.*, J. Exp

Med. 176:1191–1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918–2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando agents de entrecruzamiento heterobifuncionales de acuerdo con lo descrito por Wolff *et al.* Cancer Research 53:2560–2565 (1993). Por otro lado, se puede diseñar un anticuerpo con regiones Fc dobles y de esa manera tener una lisis del complemento y capacidades de ADCC potenciadas. Ver Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3:219–230 (1989).

WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, donde los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc de los mismos. De preferencia, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos según Eu). Preferentemente, la región Fc modificada es una región IgG1 Fc humana que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones. Dichas sustituciones se combinan opcionalmente con una o más sustituciones que aumenten la unión de C1q y/o la CDC.

Los anticuerpos con unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) modificadas han sido descriptos en WO99/51642, La patente de E.E.U.U. No. 6.194.551B1, la Patente de E.E.U.U. No. 6.242.195B1, Patente de E.E.U.U. No. 6.528.624B1 y la Patente de E.E.U.U. No. 6.538.124 (Idusogie *et al.*). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos (numeración de residuos Eu).

Para incrementar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de rescate que se une al receptor (especialmente un fragmento de anticuerpo), de acuerdo con lo descrito, por ej., en la Patente de Estados Unidos 5.739.277.

En el presente contexto, el término “epítipo de rescate de unión al receptor” 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.

Los anticuerpos con unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn) y vidas medias incrementadas han sido descriptos en WO00/42072 (Presta, L.) y US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una Región Fc con una o más sustituciones en los mismos que mejoran la unión de la Región Fc a FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener sustituciones en una o más de las

posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 o 434 (Numeración de residuos Eu). La variante de anticuerpo preferida que comprende regiones Fc con unión a FcRn mejorada comprende sustituciones de aminoácidos en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc de la misma (Numeración de residuos Eu). En una realización, el anticuerpo tiene mutaciones 307/434.

También se contemplan los anticuerpos de diseño con tres o más (preferentemente cuatro) sitios funcionales de unión al antígeno (Solic. de E.E.,U.U. No. US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque no a título de limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de las variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de cassette de una variante anteriormente preparada o una versión no variante del anticuerpo.

(v) *Inmunoconjugados*

La invención presenta asimismo inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo descrito en la presente conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados han sido descritos en párrafos anteriores. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricino A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Se dispone de 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 el agente citotóxico se preparan empleando una variedad de agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como N-succinimidil-3-(2-piridyl)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoyl) hexandiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricino de acuerdo con lo descrito por Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminapentaacético marcado con Carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede estar conjugado a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el pre-direccionamiento al tumor donde se administra el conjugado anticuerpo-receptor al individuo, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación empleando un agente aclarante y luego la administración de un "ligando" (por ej., avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ej., un radionucleótido).

(vi) *Inmunoliposomas*

El anticuerpo aquí descrito también se puede formular en forma de inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tales como las descritas por Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980) y las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un tiempo de circulación aumentada han sido descritos en la patente de E.E.U.U. No. 5.013.556.

Se pueden generar liposomas de particular utilidad mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la invención se pueden conjugar a los liposomas de acuerdo con lo descrito por Martin *et al.* *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina)

está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Ver Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989)

IX. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN Y KITS

Otra realización de la invención consiste en un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos antes descritos. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es efectiva para tratar la condición y puede tener una boca de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser una bolsa para solución intravenosa o un frasco ampolla con un tapón perforable por una aguja hipodérmica para inyección). Por lo menos un ingrediente activo de la composición es un anticuerpo anti-VEGF. La etiqueta del envase o asociado el mismo indica que la composición se utiliza para tratar una condición específica. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo envase que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable tal como salina con buffer de fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. . Puede incluir además otros materiales ventajosos desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros buffers, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. Además, el artículo de fabricación comprende un prospecto con instrucciones de uso, incluyendo, por ejemplo instrucciones al usuario de la composición para administrar la composición de anticuerpo anti-VEGF y un agente quimioterapéutico al paciente, por ej., taxano, paclitaxel, docetaxel, partículas unidas a la proteína paclitaxel (por ej., Abraxane®), análogo de platino, carboplatino, gemcitabina o combinaciones de los mismos, seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. El prospecto puede contener opcionalmente parte o todos los resultados encontrados en el Ejemplo 1 o el Ejemplo 2 o el Ejemplo 3.

El antagonista específico del VEGF puede ser envasado solo o en combinación con otros compuestos terapéuticos anticanceroso como kit. El kit puede incluir componentes opcionales que ayudan en la administración de la dosis unitaria a los pacientes, tales como frascos ampolla para reconstituir formas de polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración IV especializados, inhaladores, etc. Además, el kit de dosis unitarias puede contener instrucciones para la preparación y administración de las composiciones. En ciertas realizaciones, las instrucciones comprenden instrucciones de uso, incluyendo, por ejemplo, la instrucción al usuario de la composición para administrar la

composición de anticuerpo anti-VEGF y un agente quimioterapéutico al paciente, por ej., taxano, paclitaxel, docetaxel, partículas unidas a proteína paclitaxel (por ej., Abraxane®), análogo de platino, carboplatino, gemcitabina o combinaciones de los mismos seguida por terapia de mantenimiento con anti-VEGF. Las instrucciones pueden contener opcionalmente parte o todos los resultados encontrados en el Ejemplo 1 o el Ejemplo 2 o el Ejemplo 3. El kit se puede fabricar en forma de dosis unitaria para un uso único para un paciente, múltiples dosis para un paciente dado (a una dosis constante o en la cual la potencia de los compuestos individuales puede variar a medida que progresa la terapia) o el kit puede contener múltiples dosis para la administración a múltiples pacientes ("envase a granel"). Los componentes del kit se pueden armar en cajas de cartón, paquetes blíster, botellas, pomos y demás.

Deposito de Materiales

La siguiente línea de células de hibridoma ha sido depositada de conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, Estados Unidos:

Designación del

Anticuerpo	ATCC No.	Fecha de depósito
A4.6.1	ATCC HB-10709	29 de marzo de 1991

Los siguientes Ejemplos se ofrecen meramente a fin de ilustrar la manera de poner en práctica la invención y no se presentan a modo de limitación. Las memorias descriptivas de todas las patentes y la literatura científica aquí citadas se incorporan expresamente a la presente como referencia en su totalidad.

Ejemplo

Ejemplo 1. Ensayo en fase iii de carboplatino y paclitaxel más placebo versus carboplatino y paclitaxel más bevacizumab concomitante seguido porby placebo, versus carboplatino y paclitaxel más bevacizumab concomitante y prolongado, en mujeres con cáncer epitelial de ovarios, peritoneal primario o de trompas de falopio sin tratar en estadio iii (con citorreducción subóptima y macroscópica óptima) o iv

Se presentan los resultados de un estudio aleatorizado en fase III para evaluar nuevos programas de tratamiento para pacientes con cáncer epitelial ovárico, peritoneal primeario o de trompas de falopio en estadios III y IV según la International Federation of Gynecologic Oncology (FIGO). Los Objetivos Primarios incluyen determinar si la adición de 5 ciclos concomitantes de bevacizumab a 6

ciclos de terapia standard (carboplatino y paclitaxel) [Brazo II] aumenta la duración de la sobrevida sin progreso (PFS) en comparación con 6 ciclos de terapia standard sola [Brazo I] en mujeres con cáncer epitelial ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio recién diagnosticado en Estadío III (con la posible enfermedad residual sin tratar) y Estadío IV y para determinar si la adición de 5 ciclos concomitantes de bevacizumab más bevacizumab prolongado durante 16 ciclos además de los 6 ciclos de terapia standard (carboplatino y paclitaxel) [Brazo III] aumenta la sobrevida sin progreso en comparación con 6 ciclos de terapia standard [Brazo I] en mujeres con cáncer epitelial ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio recién diagnosticado en Estadío III (con la posible enfermedad residual sin tratar) y Estadío IV.

GOG-0182-ICON5 fue un estudio clínico aleatorizado de 5 brazos para comparar la terapia standard (carboplatino y paclitaxel) con cuatro brazos de investigación que incorporaban gemcitabina, topotecano y doxorubicina liposomal, ya sea en combinación o en forma sucesiva con paclitaxel and carboplatino. En este estudio participaron los principales grupos de ensayos clínicos de cáncer ovárico en el mundo. Esta colaboración internacional aportó una oportunidad única de acumular grandes números de pacientes de manera oportuna, lo que facilitó la evaluación simultánea de múltiples agentes en un ensayo aleatorizado prospectivo. Con la participación internacional, el reclutamiento excedió los 1.200 pacientes por año y el estudio alcanzó su meta de reclutamiento dentro de los cuatro años de su activación.

Si bien los resultados del GOG-0182-ICON5 contribuyeron a establecer la quimioterapia óptima para pacientes sin tratamientos anteriores con cáncer ovárico avanzado y peritoneal primario, la siguiente generación de ensayos clínicos habrá de explorar el impacto de las terapias moleculares direccionadas en combinación con la quimioterapia. En particular, los inhibidores de la transducción de señal de factores de crecimiento y los agentes antiangiogénicos como agentes únicos y en combinación con drogas quimioterapéuticas están siendo objeto de estudios en mujeres con estos tumores. Se ha demostrado que muchos de estos agentes tienen efectos citostáticos y han demostrado tener sinergia con la quimioterapia en modelos experimentales de cáncer humano. En este ensayo de fase III, se evaluó el impacto sobre el resultado de los agentes biológicos activos combinación con terapia quimioterapéutica standard más o menos la administración prolongada de un solo agente en comparación con la terapia quimioterapéutica sola, en pacientes con enfermedad avanzada.

El bevacizumab es una versión recombinante humanizada de un anticuerpo monoclonal VEGF anti-humano, denominado rhuMAb VEGF. El bevacizumab ha sido promovido al desarrollo clínico para usar como agente único para inducir la inhibición del desarrollo de tumores en pacientes con tumores solos y para usar en combinación con quimioterapia citotóxica para retardar el tiempo hasta el progreso de la enfermedad en pacientes con tumores sólidos emtastásicos. Ver, por ej., Presta LG, et al. *Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders*. Cancer Res 57:4593–9, 1997. Los resultados de dos ensayos de agente único de bevacizumab para pacientes con cáncer epitelial ovárico recurrente y peritoneal primario ya han sido publicados. Ver, por ej., Burger RA, et al., *Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study*. J Clin Oncol 25(33):5165–5171, 2007; and, Cannistra SA, et al., *Phase II Study of Bevacizumab in Patients with Platinum Resistant ovarian cancer or Primary Peritoneal Serous Cancer*. J Clin Oncol 25(33):5180–86, 2007. GOG (GOG-0170-D) utilizó dos puntos finales de eficacia co-primarios: respuesta clínica según criterios de NCI RECIST y proporción de sobrevida sin progreso durante por lo menos 6 meses. 62 participantes recibieron bevacizumab a razón de 15 mg/kg cada 21 días hasta manifestar evidencia clínica o radiográfica de progreso de la enfermedad o desarrollo de toxicidad inadmisibles. Las características de la enfermedad primaria fueron típicas de los pacientes con cáncer ovárico recurrente y aproximadamente 43% de los pacientes fueron consideradas fundamentalmente resistentes al platino. Se observó una tasa de respuesta de 21% y 40% estuvieron libres de progreso durante por lo menos 6 meses, con una media de PFS de 4,7 meses, en comparación con 1,8 meses en el caso de un control histórico basado en ensayos previos en fase II negativa de agentes citotóxicos en poblaciones con características clínicas similares. Genentech AVF 2949 examinó pacientes con un perfil de riesgo más alto en términos del potencial de progreso de la enfermedad y eventos adversos, admitiendo sólo a las pacientes consideradas primaria o secundariamente resistentes al platino y que han recibido 2 o 3 regímenes citotóxicos anteriores. Estas diferencias de elegibilidad se tradujeron, en última instancia, en un nivel más alto de resistencia al platino, un mayor número de regímenes anteriores y un perfil de estado de actividad ligeramente peor en la población AVF. Se trataron cuarenta y cuatro pacientes con la misma dosis y esquema de bevacizumab utilizado en GOG 170-D. Se documentaron siete (16%)

respuestas y 12 (27%) se mantuvieron sin progreso durante por lo menos 6 meses.

En este estudio se seleccionaron dos brazos experimentales para comparar con la quimioterapia citotóxica standard con paclitaxel y carboplatino: uno que incorporó 5 ciclos de bevacizumab (bevacizumab concomitante) y el otro con bevacizumab durante 16 ciclos adicionales una vez completada la quimioterapia con paclitaxel y carboplatino (bevacizumab prolongado). La administración y las dosis están indicadas en las figuras 1 y 2. Fórmula de Calvert Para la Dosificación de Carboplatino (ABC):

Dosis total (mg)= ABC objetivo (en mg/ml/minuto)*[GFR (en ml/minuto) + 25].

El diseño estadístico para el punto final primario del estudio se basó en 90% de potencia para detectar la relación de riesgo de PFS ($HR \leq 0,77$) (desplazamiento de la media de PFS: 14,0 meses (histórico)→18,2 meses. El análisis primario comparó la PFS evaluada por el investigador por cada brazo de bevacizumab versus el control ((análisis 1→por RECIST (ver, *por ej.*, Therasse et al., J Natl. Cancer Inst., 92:205–16, 2000), deterioro clínico global o CA–125; o por el análisis 2→ RECIST o deterioro clínico global, CA–125 con censura). En la Tabla 1 se encuentran las características clínicas de base de las pacientes. Las características quirúrgico–patológicos de base de las pacientes están consignadas en la Tabla 2.

Pacientes Aptas para ser Eligidas: Pacientes con diagnóstico histológico de cáncer epitelial ovárico, carcinoma peritoneal primario o cáncer de trompas de falopio; Estadío III FIGO con cualquier enfermedad residual sin tratar (macroscópica o palpable) o Estadío IV FIGO, definido quirúrgicamente al completarse la cirugía abdominal inicial y con el tejido apropiado disponible para la evaluación histológica. La cirugía mínima necesaria como cirugía abdominal que procura el tejido para la evaluación histológica y establecer y documentar el sitio primario y el estadio, como así también como máximo esfuerzo para la citorreducción de los tumores. En caso de haberse practicado una cirugía adicional, debe haber sido de acuerdo con la cirugía apropiada para el carcinoma ovárico o peritoneal descrito en el GOG Surgical Procedures Manual (<https://www.gog.fccc.edu/manuals/pdf/surgman.pdf>). Sin embargo, no es necesario que el cirujano haya realizado todos los puntos contenidos en esta sección del GOG Surgical Procedures Manual. Las pacientes con cáncer en Estadío III en el cual el diámetro máximo mayor de cualquier tumor residual

implantado al completarse esta cirugía inicial que no supera 1 cm se define como “óptima”, todas las demás se definen como “subóptima”. No se requiere enfermedad apreciable en los estudios de imágenes postoperatorios para la admisión.

Las pacientes con los siguientes tipos histológicos de células epiteliales son aptas para la admisión: Adenocarcinoma seroso, adenocarcinoma endometroide, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma no diferenciado, adenocarcinoma de células caras, carcinoma epitelial mixto, carcinoma de células transicionales, Tumor maligno de Brenner o adenocarcinoma no especificado de otra manera (N.O.S.). Sin embargo, las características histológicas del tumor deben ser compatibles con un adenocarcinoma epitelial primario de Müller. Las pacientes pueden tener carcinoma de trompas de falopio in situ coexistentes, siempre que el origen primario del tumor invasivo sea ovárico, peritoneal o de trompas de falopio.

Las pacientes deben tener adecuada:

- (1) Función de la médula ósea: Recuento absoluto de neutrófilos (ANC) superior o igual a 1.500/ μ l, equivalente a los Criterios Comunes de Toxicidad correspondientes a Eventos Adversos v3.0 (CTCAE) Grade1. Este ANC no puede haber sido inducido ni sostenido por factores estimulantes de colonias de granulocitos.
- (2) Plaquetas en número mayor o igual a 100.000/ μ l. (CTCAE Grado 0–1).
- (3) Función renal: Creatinina $\leq$ 1,5 x límite superior normal institucional (ULN), CTCAE Grado 1.
- (4) Función hepática:
 - (a) Bilirrubina inferior o igual a 1,5 x ULN (CTCAE Grado 1).
 - (b) SGOT y fosfatasa alcalina inferior o igual a 2,5 x ULN (CTCAE Grado 1).
- (c) Función Neurológica: Neuropatía (sensorial o motora) inferior o igual a CTCAE Grado 1.
- (5) Parámetros de coagulación sanguínea: PT tal que la relación normalizada internacional (INR) sea $\leq$ 1.5 (o una INR en rango, habitualmente de entre 2 y 3, si una paciente se encuentra recibiendo una dosis estable de warfarina terapéutica para el control de las trombosis venosas, incluyendo la tromboembolia pulmonar) y una PTT < 1,2 veces el límite superior normal.
- (6) Pacientes con un Estado de Actividad GOG de 0, 1 o 2.
- (7) Las pacientes se deben anotar entre 1 y 12 semanas después de la cirugía inicial practicada con el fin combinado de diagnóstico, determinación de estadio y citorreducción.

- (8) Son aptas para la admisión las pacientes con enfermedad medible y no medible. Las pacientes pueden o no tener síntomas relacionados con el cáncer.
- (9) Las pacientes que han reunido los requisitos previos al ingreso especificados en la Sección 7.0.
- (10) Un consentimiento informado y autorización aprobadas que permitan la liberación de la información sanitaria personal debe ser firmado por el paciente o un tutor.
- (11) Las pacientes de este ensayo pueden recibir terapia de reemplazo hormonal de estrógeno ovárico +/- progestina en las dosis más bajas efectivas para el control de los síntomas de menopausia en cualquier momento, aunque no progestinas para el control de la anorexia mientras está en el protocolo de terapia dirigida o antes del progreso de la enfermedad.

Pacientes no aptas para la ADmisión: Pacientes con diagnóstico acutal de tumor ovárico epitelial borderline (antes denominados "tumores de bajo potencial maligno") o cáncer epitelial ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio invasivo recurrente tratado con cirugía solamente (como en el caso de pacientes con cánceres epiteliales ováricos o de trompas de falopio de bajo grado en Estadío Ia o Ib I) no son aptas para la admisión. Las pacientes con diagnóstico anterior de tumor borderline que ha sido extirpado quirúrgicamente y que seguidamente desarrollan un nuevo cáncer invasivo epitelial ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio no relacionado son admisibles, siempre que no hayan recibido quimioterapia anterior para ningún tumor ovárico.

Las pacientes que han recibido radioterapia anterior en cualquier porción de la cavidad abdominal o la pelvis están excluidas. La radiación anterior para el cáncer localizado de mama, cabeza y cuello o piel está permitida, siempre que hayan transcurrido más de tres años completos antes de la matriculación y la paciente se mantenga libre de enfermedad recurrente o metastásica.

Las pacientes que han recibido quimioterapia anterior para cualquier tumor abdominal o pélvico, incluyendo quimioterapia neoadyuvante para su cáncer ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio están excluidas. Las pacientes pueden haber recibido quimioterapia adyuvante anterior para el cáncer de mama localizado, siempre que se hayan cumplido más de tres años antes de la inscripción y que la paciente se mantenga libre de enfermedad recurrente o metastásica..

Las pacientes que han recibido cualquier terapia direccionada (incluyendo, aunque no a modo de limitación, vacunas, anticuerpos, inhibidores de la tirosina

quinasa) o terapia hormonal para el control de su cáncer epitelial ovárico o peritoneal primario.

Las pacientes con cáncer de endometrio primario sincrónico o historia pasada de cáncer de endometrio primario están excluidas, a menos que se cumplan todas las condiciones siguientes: Estadío no superior a I–B; invasión de miometrio no más que superficial, sin invasión vascular o linfática, ningún subtipo mal diferenciado, incluyendo seroso papilar, de células claras u otras lesiones FIGO Grado 3.

A excepción del cáncer de piel no melanoma y otras malignidades específicas antes citadas, las pacientes con otras malignidades invasivas que han tenido (o tienen) evidencia de otro cáncer presente dentro de los últimos cinco años o cuyo tratamiento del cáncer anterior se contraindica con este protocolo de terapia están excluidas.

Las pacientes con hepatitis aguda o infección activa que requiere antibióticos parenterales.

Pacientes con heridas graves, úlceras o fracturas óseas sin cicatrización. Esto incluye historia de fístula abdominal, perforación gastrointestinal o absceso intraabdominal dentro de los 28 días. Las pacientes con cicatrización de incisiones granulares que cicatrizan por intención secundaria sin evidencia de dehiscencia fascial o de infección son aptas para la admisión pero requieren exámenes semanales de la herida.

Pacientes con sangrado activo o condiciones patológicas que acarreen alto riesgo de sangrado, tal como un trastorno sangrante conocido, coagulopatía o tumor que involucra vasos importantes.

Pacientes con historia o evidencia, ante el examen físico, de enfermedad del SNC, incluyendo tumor cerebral primario, convulsiones no controladas con terapia médica standard, cualquier metástasis cerebral o historia de accidente cerebrovascular (ACV, apoplejía), ataque isquémico transitorio (AIT) o hemorragia subaracnoide dentro de los seis meses de la primera fecha de tratamiento en este estudio.

Pacientes con enfermedad cardiovascular clínicamente significativa. Esto incluye:

Hipertensión descontrolada, definida como sistólica > 150 mm de Hg o diastólica > 90 mm de Hg.; Infarto de miocardio o angina inestable < 6 meses antes de la matriculación; insuficiencia cardíaca Grado II o superior según New York Heart Association (NYHA); Arritmia cardíaca grave que requiere medicación. Esto no

incluye la fibrilación auricular asintomática con velocidad ventricular controlada; enfermedad vascular periférica CTCAE Grado 2 o superior (por lo menos breves (<24 h) episodios de isquemia controlada en forma no quirúrgica y sin déficit permanente); Historia de ACV dentro de los seis meses.

Pacientes con hipersensibilidad conocida a los productos de células de ovario de hámster chino u otros anticuerpos recombinantes humanos o humanizados.

Pacientes con proteinuria clínicamente significativa. La Proteína en orina debe ser analizada según la relación de proteína–creatinina en orina (UPCR). Se ha encontrado que la UPCR se correlaciona directamente con la cantidad de proteína excretada en una recolección de orina de 24 horas. Ver, por ej., Ginsberg JM, et al., *Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria*. N Engl J Med 309:1543–6, 1983; Rodby RA, et al., *The urine protein to creatinine ratio as a predictor of 24–hour urine protein excretion in type 1 diabetic patients with nephropathy*. *The Collaborative Study Group*. Am J Kidney Dis 26:904–9, 1995; Schwab SJ, et al., *Quantitation of proteinuria by the use of protein–to–creatinine ratios in single urine samples*. Arch Intern Med 147:943–4, 1987; Steinhauslin F, & Wauters JP. *Quantitation of proteinuria in kidney transplant patients: accuracy of the urinary protein/creatinine ratio*. Clin Nephrol 43:110–5, 1995; Wilson DM, & Anderson RL. *Protein–osmolality ratio for the quantitative assessment of proteinuria from a random urinalysis sample*. Am J Clin Pathol 100:419–24, 1993 y Zelmanovitz T, et al., *Proteinuria is still useful for the screening and diagnosis of overt diabetic nephropathy*. Diabetes Care 21:1076–9, 1998. Específicamente, una UPCR de 1,0 es equivalente a 1,0 gramo de proteína en una recolección de orina de 24 horas. Las pacientes deben tener una UPCR < 1,0 para ser admitidas en este estudio.

Pacientes con o estimación de procedimientos invasivos de acuerdo con lo definido a continuación: Prodecimiento de cirugía mayor, biopsia abierta o lesión traumática significativa dentro de los 28 días anteriores a la primera fecha de terapia con bevacizumab/ placebo (ciclo 2). Procedimiento de cirugía mayor estimado durante el curso del estudio. Esto incluye, aunque no a modo de limitación, cirugía abdominal (laparotomía o laparoscopia) anterior al progreso de la enfermedad, como por ejemplo colostomía o enterostomía reversa, cirugía citorreductora de intervalo o secundaria o cirugía de segunda inspección. Biopsia Core dentro de los 7 días anteriores a la primera fecha de terapia con bevacizumab/placebo (ciclo 2).

Pacientes con Actividad GOG Grado de 3 o 4.

Pacientes embarazadas o amamantando.

Pacientes de menos de 18 años.

Pacientes que han recibido terapia anterior con cualquier droga anti-VEGF, incluyendo bevacizumab.

Pacientes con síntomas o signos clínicos de obstrucción gastrointestinal y que requieren hidratación y/o nutrición parenteral.

Pacientes con otra historia o condición médica que, a criterio del médico, pudiera impedir la participación en el estudio.

La respuesta y progreso han de ser evaluados en este estudio utilizando los criterios internacionales propuestos por el Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) Committee. Ver, por ej., Therasse P, et al. *New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada.* J Natl Cancer Inst 92:205–16, 2000. En los criterios RECIST se utilizan los cambios sólo del diámetro mayor (medición unidimensional) de las lesiones tumorales .

CA-125 como Marcador Biológico de la Enfermedad Progresiva: Los niveles séricos de CA-125, un antígeno de glucoproteína asociado a tumores, son elevados en 80% de las pacientes con cáncer epitelial ovárico. Ver, por ej., Bast et al., N. Engl. J. Med. 309:88307, 1983. CA-125 ha sido monitoreada, con frecuencia para verificar la respuesta a la terapia, la presencia de enfermedad residual y como evidencia precoz de recurrencia. Sin embargo, CA-125, no es enteramente específico de ciertos tumores y puede ser elevada en una variedad de condiciones benignas tales como endometriosis, fibroides uterinos e inflamación pélvica; esto es particularmente así en mujeres premenopáusicas. Además, los niveles de CA-125 pueden ser discordantes con la respuesta tumoral, tanto como tendencias a falso positivo como a falso negativos; la influencia de los agentes biológicos en estas imprecisiones no ha sido dilucidada. De todas maneras, la práctica normal ha sido que las pacientes y los médicos interpreten una elevación progresiva de la CA-125 posterior a la terapia como evidencia de enfermedad recurrente o progresiva y deben tomar decisiones terapéuticas basándose en CA-125. El presente estudio aleatorizado emplea una fórmula conservadora para definir la enfermedad progresiva sobre la base de la elevación en serie de la CA-125, (además de otras definiciones standard en el control de los tumores sólidos), aunque sólo después de completarse la

quimioterapia inicial. Ver, *por ej.*, Guppy et al., Oncologists, 7:437043, 2002; Rustin et al., J. Clin. Oncol. 19:4054–7, 2001; Rustin, J. J. Clin. Oncol., 21:187–93, 2003; Rustin et al., Clin. Cancer Res. 10:3919–26, 2004 y Rustin et al., J Natl. Cancer Inst., 96:487–8, 2004. En un ejemplo, se puede determinar el progreso basado en la CA–125 sérica sólo durante el período posterior a la finalización de la quimioterapia citotóxica, si se cumple una de las tres condiciones: 1) las pacientes con CA–125 pretratamiento elevada y normalización de CA–125 deben exhibir evidencia de CA–125 superior o igual al doble del límite superior normal en dos ocasiones distanciadas por lo menos una semana o 2) las pacientes con CA–125 elevada pretratamiento, que nunca se normaliza, deben exhibir evidencia de CA–125 superior o igual al doble del límite superior normal en dos ocasiones distanciadas por lo menos una semana o 3) las pacientes con CA–125 en el rango normal pretratamiento deben exhibir evidencia de CA–125 superior o igual al doble del límite superior normal en dos ocasiones distanciadas por lo menos una semana.

RESULTADOS

Los resultados del estudio demuestran que el bevacizumab es efectivo para el cáncer ovárico de primera línea en combinación con quimioterapia y continuado como terapia de mantenimiento. Esta combinación fue eficaz para aumentar la PFS. La evaluación preliminar de la seguridad identificó eventos adversos relacionados con el bevacizumab (AEs) notados en estudios anteriores. El análisis primario de la PFS demostró una mediana de sobrevida sin progreso (meses) de 10,3 (en el brazo uno de la **figura 2**) en comparación con 14,1 meses en el brazo tres de la **figura 2**. La HR (95% CI) fue de 0,908 (0,795, 1,04) con un valor p de una vía (rango logarítmico de 0,08) en el brazo I de la **figura 2** en comparación con 0,717 (0,625, 0,824) con un valor p de una vía (rango logarítmico) de <0,001 en el brazo III de la **figura 2**. Ver la **figura 5**. La diferencia fue estadísticamente significativa. El régimen de tratamiento fue generalmente bien tolerado y los eventos adversos (incluyendo la perforación GI) fueron similares a los estudios anteriores con bevacizumab. Ver la **figura 3** y la **figura 4**. Esta es la primera terapia anti–angiogénica que demuestra beneficios en esta población. La **figura 6** ilustra la ramificación del uso de CA–125 como determinante del progreso. CA–125 es un determinante antigénico en una glucoproteína de alto peso molecular reconocida por un anticuerpo monoclonal (OC–125), que se produce utilizando una línea celular de cáncer ovárico como inmunógeno. CA 125 ha sido evaluada como marcador sérico para monitorear pacientes con carcinoma epitelial ovárico y

otros cánceres. Ver, *por ej.*, las referencias Gyn Oncol 38:373, 1990; Gyn Oncol 38:181, 1990; Amer J Ob Gyn 160:667, 1989; Amer J Ob Gyn 159:873, 1988; Amer J Ob Gyn 159:341, 1988; Ob Gyn 72:159, 1988 y Gyn Oncol 36:299, 1990 y las descripciones aquí presentadas. La **figura 7** ilustra análisis de subgrupos del Brazo I versus el Brazo III.

Tabla 1: Características Clínicas Basales

Característica	Brazo I CP (n=625)	Brazo II CP + BEV (n=625)	Brazo III CP + BEV → BEV (n=623)
Media de edad, años (rango)	60 (25–86)	60 (24–88)	60 (22–89)
Raza, n (%)			
Blanca no hispana	526 (84)	519 (83)	521 (84)
Asiática	41 (7)	37 (6)	39 (6)
Negra no hispana	25 (4)	28 (5)	27 (4)
Hispanica	21 (3)	28 (5)	25 (4)
Otras, especificadas	8 (1)	5 (<1)	4 (<1)
GOG PS, n (%)			
0	311 (50)	315 (50)	305 (49)
1	272 (44)	270 (43)	267 (43)
2	42 (7)	40 (6)	51 (8)

Tabla 2: Características Quirúrgicas–Patológicas de Base

Característica, n (%)	Brazo I CP (n=625)	Brazo II CP + BEV (n=625)	Brazo III CP + BEV → BEV (n=623)
Estadio/tamaño residual			
III óptimo (macroscópico)	218 (35)	205 (33)	216 (35)
III subóptimo	254 (41)	256 (41)	242 (39)
IV	153 (25)	164 (26)	165 (27)
Histología			
Serosas	543 (87)	523 (84)	525 (84)
Endometriode	20 (3)	15 (2)	25 (4)
Células claras	11 (2)	23 (4)	18 (3)
Mucinosas	8 (1)	5 (<1)	8 (1)
Grado del tumor			
3a	412 (66)	435 (70)	430 (69)
2	94 (15)	77 (12)	92 (15)
1	33 (5)	28 (4)	16 (3)
Not especificada/pendiente	86 (14)	85 (14)	85 (14)

Ejemplo 2. Ensayo aleatorizado multicéntrico de dos brazos intergrupo de cáncer ginecológico de la adición de bevacizumab a la quimioterapia standard (carboplatino y paclitaxel) en pacientes con cáncer epitelial ovárico

Se presentan los resultados de un estudio aleatorizado en fase II (ICON7) para evaluar la seguridad y eficacia de la adición de bevacizumab a la quimioterapia standard con carboplatino y paclitaxel. El punto final primario era determinar si la adición de bevacizumab a la quimioterapia standard mejora la sobrevida sin progreso (PFS) en comparación con la quimioterapia standard sola en mujeres con cáncer epitelial ovárico, de trompas de falopio o peritoneal primario recién diagnosticado, confirmado histológicamente, de alto riesgo, en Estadío I y IIa según la International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO) (Grado 3 o carcinoma de células claras solamente) y Estadío IIb – IV FIGO (todos los grados y todos los tipos histológicos), que han sido sometidos a cirugía inicial (cirugía citorreductora para recortar volumen o biopsia si la paciente tiene la enfermedad en Estadío IV de FIGO) y que no sería tomada en cuenta para cirugía citorreductora antes del progreso de la enfermedad. Los puntos finales secundarios incluían la sobrevida total (OS), la tasa de respuesta, la duración de la respuesta, el intervalo biológico sin progreso (definido por el aumento de CA 125 o PFI_{BIO}), la seguridad y la calidad de vida. ICON7 fue un estudio clínico aleatorizado de 2 brazos que comparó la terapia standard (carboplatino y paclitaxel) con un brazo de investigación que incorporó bevacizumab en combinación con paclitaxel y carboplatino (ver **la figura 8**). Un total de 1528 mujeres elegibles participaron en el estudio.

Bevacizumab es una versión recombinante humanizada de un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano denominado rhuMAb VEGF. El Bevacizumab ha sido llevado al desarrollo clínico para usar como agente único para inducir la inhibición del desarrollo de tumores en pacientes con tumores sólidos para usar en combinación con quimioterapia citotóxica para retrasar el tiempo hasta el progreso de la enfermedad en pacientes con tumores sólidos metastásicos. Ver, por ej., Presta LG, et al. *Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders*. Cancer Res 57:4593–9, 1997.

Selección de Pacientes

ICON7 incluyó pacientes con cáncer epitelial ovárico, de trompas de falopio

o peritoneal primario recién diagnosticado, histológicamente confirmado de alto riesgo en Estadío I y IIa FIGO(Grado 3 or carcinoma de células claras solamente) y Estadío IIb – IV FIGO (todos los grados y todos los tipos histológicos), que se han sometido a cirugía inicial (ya sea citorreductora para reducir el volumen o biopsia si la paciente tiene la enfermedad en el Estadío IV FIGO) y que no serían tenidas en cuenta para cirugía citorreductora con anterioridad al progreso de la enfermedad. Las pacientes con enfermedad mensurable y no mensurable son aptas para la admisión. Las pacientes fueron consideradas aptas para matricularse en este ensayo si cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión enumerados a continuación:

Criterios de Inclusión de Pacientes:

- Mujeres de ≥ 18 años de edad
- Histológicamente confirmada, con biopsia de núcleo de un sitio de enfermedad como requisito mínimo (la citología sola era insuficiente para el diagnóstico)
 - Cáncer Epitelial ovárico
 - Carcinoma peritoneal primario (debe ser del tipo histológico papilar-seroso) o
 - Carcinoma de trompas de falopio
- Y que cumplen los criterios de la Tabla 3

Las pacientes con carcinoma de células claras en cualquier estadío fueron consideradas aptas debido al pronóstico más desfavorable asociado a este subtipo. Las pacientes con carcinoma epitelial ovárico o de trompas de falopio anterior en etapa precoz tratada con cirugía sola fueron consideradas aptas al momento del diagnóstico de recurrencia abdomino-pélvica siempre que no se hubiera planeado terapia citorreductora adicional antes del progreso de la enfermedad.

En el marco de este ensayo, el carcinoma de células claras se definió como $\geq 50\%$ de elementos de células claras presentes o informado como carcinoma de células claras por el patólogo local.

Tabla 3: Criterios Histológicos de Elegibilidad

FIGO Estadío	Elegible		
	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Ia	No ^E	No ^E	Sí
Ib	No ^E	No ^E	Sí
Ic	No ^E	No ^E	Sí

Ila	No ^E	No ^E	Sí
Ilb	Sí	Sí	Sí
Ilc	Sí	Sí	Sí
III	Sí	Sí	Sí
IV	Sí	Sí	Sí

Grado se refiere a 1 (bien diferenciado), 2 (moderadamente diferenciado) y 3 (poco diferenciado)

E= Excepto los pacientes con carcinoma de células claras que son eligibles independientemente del estadio FIGO

- Las pacientes ya deben haberse sometido a cirugía citorreductora practicada por un cirujano experimentado en el control del cáncer ovárico, con el fin de una citorreducción quirúrgica máxima de acuerdo con la Declaración de GCIIG Conference Consensus Statement. Bi debe haber ninguna cirugía citorreductora planificada con anterioridad al progreso de la enfermedad.
 - Pacientes con enfermedad en Estadio III y IV en quienes la cirugía citorreductora aún no era apropiada eran aún elegibles siempre que
 - la paciente tuviera un diagnóstico histológico y
 - no se previera cirugía citorreductora antes del progreso de la enfermedad
 - Las pacientes deben haber podido comenzar la terapia sistémica dentro de las ocho semanas de la cirugía citorreductora. Si la paciente hubiera sido asignada aleatoriamente al brazo de investigación, luego se debe omitir la primera dosis de bevacizumab si el investigador decide iniciar la quimioterapia dentro de las 4 semanas de la cirugía.
 - Si una paciente tuvo dos operaciones, por ejemplo una operación inicial para eliminar lo que se pensaba que era un quiste benigno y luego una segunda operación gino-oncológica para determinar formalmente el estadio y reducir al máximo el tamaño del tumor ovárico, luego se documentó la fecha de la segunda operación como fecha de la cirugía; el primer tratamiento sistémico se inició dentro de las ocho semanas de esta fecha. Se registró la fecha del diagnóstico como fecha de la operación inicial en que se diagnosticara el cáncer ovárico.

- Estado de actividad ECOG (PS) 0–2
- Expectativa de vida >12 semanas
- Función de médula ósea adecuada (se controlaron/calcularon todos los parámetros en sangre postoperatoria) (dentro de los 28 días anteriores a la aleatorización)
 - Recuento Absoluto de Neutrófilos (ANC) $\geq 1,5 \times 10^9/l$
 - Plaquetas (PLT) $\geq 100 \times 10^9/l$
 - Hemoglobina (Hb) ≥ 9 g/dl (puede ser post-transfusión)
- Se controlaron los parámetros de coagulación adecuados (se controlaron/calcularon todos los parámetros en sangre postoperatoria) (dentro de los 28 días anteriores a la aleatorización)
 - Tiempo de ProTrombina Activada (APTT) $\leq 1,5 \times$ ULN; o bien
 - Relación Normalizada Internacional (INR) $\leq 1,5$ (la medición de la INR fue indispensable si la paciente estaba recibiendo tratamiento con warfarina)
- Función hepática adecuada (se controlaron/calcularon todos los parámetros en sangre postoperatoria) (dentro de los 28 días anteriores a la aleatorización)
 - Bilirrubina sérica (BR) $\leq 1,5 \times$ ULN
 - Transaminasas séricas $\leq 2,5 \times$ ULN
- Tira reactiva

Criterios de Exclusión de Pacientes:

- Cáncer ovárico no epitelial, incluyendo tumores Mullerianos malignos mixtos
- Tumores borderline (tumores de bajo potencial maligno)
- Quimioterapia citotóxica intraperitoneal planificada
- Terapia anti-cáncer sistémica anterior para el cáncer ovárico (por ejemplo quimioterapia, terapia con anticuerpos monoclonales, terapia con inhibidor de la tirosina quinasa o terapia hormonal)
- Cirugía (incluyendo biopsia abierta) dentro de las 4 semanas antes de la primera dosis de bevacizumab estimada (que permitió omitir el bevacizumab del primer ciclo de quimioterapia)
- Cualquier cirugía planeada durante el período de 58 semanas desde el comienzo del tratamiento del estudio (54 semanas de tratamiento más 4 semanas adicionales para dar lugar al clearance del bevacizumab)

- Hipertensión descontrolada (las mediciones de presión sanguínea se registraron en las pacientes después de 5 minutos de reposo y en posición sentada) (Elevación sostenida de la PS > 150/100mmHg pese a la terapia antihipertensiva)
- Toda radioterapia anterior en el abdomen o pelvis
- Lesión traumática significativa durante 4 semanas anteriores a la primera dosis potencial de bevacizumab
- Historia o sospecha clínica de metástasis cerebral o compresión de la médula espinal. Es indispensable una CT/MRI del cerebro (dentro de las 4 semanas anteriores a la aleatorización) en caso de sospecha de metástasis cerebrales. La MRI espinal es indispensable (dentro de las 4 semanas anteriores a la aleatorización) en caso de sospecha de compresión de la médula espinal
- Historia o evidencia, tras el examen neurológico, de enfermedad del sistema nervioso central (SNC), a menos que se trate adecuadamente con terapia standard por ej. convulsiones sin control
- Accidente Cerebrovascular Anterior (ACV), Ataque Isquémico Transitorio (TIA) o Hemorragia subaracnoide (SAH) dentro de los seis meses anteriores a la aleatorización
- La mujer fértil con potencial de embarazo sin voluntad de utilizar anticonceptivos (anticonceptivos orales, dispositivo intrauterino o método de barrera en combinación con jalea espermicida o quirúrgicamente estéril) durante la duración del estudio y por lo menos seis meses posteriores
- Mujeres embarazadas o amamantando
- Exposición anterior al anticuerpo CA 125 de ratón
- Tratamiento con algún otro agente en investigación o participación en otro estudio clínico dentro de los 30 días anteriores al ingreso en este estudio
- Malignidades que no son de cáncer ovárico dentro de los 5 años anteriores a la aleatorización, excepto por el carcinoma in situ de cuello del útero adecuadamente tratado y/o cáncer de piel basocelular y/o carcinoma endometrial precoz como se especifica a continuación. Las pacientes que han recibido quimioterapia adyuvante anterior para otras malignidades, por ej. carcinoma de mama o colorrectal si se lo hubiera diagnosticado 5 años antes sin evidencia de recurrencia posterior

- Las pacientes con carcinoma endometrial primario sincrónico o historia pasada de carcinoma endometrial primario fueron excluidas, a menos que se cumplieran TODOS los siguientes criterios para describir el carcinoma de endometrio
 - Estadío $\leq$ Ib
 - Invasión del miométrico no más que superficial
 - Sin invasión linfovascular
 - No poco diferenciada (es decir ni Grado 3 ni células papilares serosas ni claras)
- Hipersensibilidad conocida al bevacizumab y sus excipientes o quimioterapia (incluyendo cremophor)
- Herida, úlcera o fractura ósea que no cicatriza. Las pacientes con incisiones granulantes que cicatrizan por intención secundaria sin evidencia de dehiscencia fascial ni infección fueron admitidas, aunque requirieron tres exámenes semanales de las heridas
- Historia o evidencia de trastornos trombóticos o hemorrágicos
- Enfermedad cardiovascular clínicamente significativa, que incluye
 - Infarto de miocardio o angina inestable < 6 meses antes de la aleatorización
 - Insuficiencia Cardíaca Congestiva (ICC) $\geq$ Grado 2 New York Heart Association (NYHA)
 - Arritmia cardíaca mal controlada pese a la medicación (las pacientes con fibrilación auricular con velocidad controlada fueron elegibles)
 - Enfermedad vascular periférica grado $\geq$ 3 (es decir sintomática y que interfiere con las actividades cotidianas [ADL] que requiere reparación o revisión)
- Uso crónico actual o reciente (dentro de los 10 días anteriores al 1 ciclo de tratamiento) El uso crónico de aspirina >325 mg/día (aspirina en bajas dosis (<325 mg/día) no pareció aumentar el riesgo de sangrado de grado 3–4 cuando se la utilizó con bevacizumab más quimioterapia; por lo tanto, no se prohibió el uso de aspirina profiláctica en bajas dosis en pacientes en riesgo de un evento tromboembólico arterial en este protocolo de ensayo)
- Uso actual o reciente urrent or recent (dentro de los 10 días anteriores al 1 ciclo de tratamiento) El uso de anticoagulantes orales o parenterales en

dosis total para fines terapéuticos (excepto por la patencia lineal, en la cual la INR se debe mantener debajo de 1,5)

- Neuropatía sensorial o motora preexistente $\geq$ Grado 2
- Evidencia de cualquier otra enfermedad, disfunción metabólica, hallazgo por examen físico o hallazgo de laboratorio que ofrezca sospecha razonable de una enfermedad o condición que contraindique el uso de una droga en investigación o que ponga a la paciente en alto riesgo de complicaciones relacionadas con el tratamiento

Se realizaron evaluaciones de los tumores, por barrido de TC o RMI, con mediciones que utilizaban los criterios RECIST, al cabo de tres y seis ciclos de quimioterapia y a alrededor de los nueve meses y 12 meses en el primer año o después del ciclo 12 y el ciclo 18 de tratamiento en el caso de los pacientes del brazo de investigación. En el segundo y tercer años del ensayo se repitieron las evaluaciones de los tumores cada seis meses y posteriormente según las indicaciones clínicas. Estas exploraciones se llevaron a cabo independientemente del hecho de si la paciente ha sido óptima o subóptimamente citorreducida e independientemente de si hay una enfermedad apreciable o no, en la exploración basal.

Las pacientes fueron clínicamente evaluadas y se midió el CA 125 al comienzo de cada ciclo de quimioterapia y luego cada seis semanas durante el primer año del ensayo. En el segundo y tercer año del ensayo, las pacientes fueron evaluadas y se midió el CA 125 medido cada tres meses. En el cuarto y quinto años, las pacientes fueron clínicamente evaluadas y se midió el CA 125 cada seis meses. A continuación las evaluaciones se realizaron anualmente. El progreso basado sólo en los criterios de CA 125 se verificó con una exploración de TC. Si esta dio negativa se la repetía en el momento de sospecharse el progreso clínico.

Una vez que la evidencia del protocolo definió el progreso de la enfermedad, se siguió a las pacientes para determinar la supervivencia y el tratamiento subsiguiente para el cáncer ovárico cada seis meses durante los primeros cinco años de su seguimiento en el ensayo y anualmente después.

Se realizaron exámenes físicos y análisis de sangre de rutina regulares durante el tratamiento para monitorear la seguridad de las pacientes. Se evaluó la calidad de vida (QoL) utilizando los cuestionarios EORTC QLQ C-30+OV-28 y EQ-5D al comienzo de cada ciclo de quimioterapia, cada seis semanas hasta el

final del primer año y luego cada tres meses hasta el comienzo del tratamiento del progreso o al final del año dos. Todas las pacientes aún con vida a los tres años de la aleatorización completaron un formulario QoL adicional. Se documentaron los eventos adversos y el uso de recursos médicos durante el tratamiento del estudio y el período de seguimiento.

RESULTADOS

Los resultados del estudio demuestran que el bevacizumab es efectivo para un cáncer ovárico de primera línea si se lo combina con quimioterapia y se continúa como terapia de mantenimiento durante un período total de 12 meses. Esta combinación fue efectiva para aumentar la sobrevida sin progreso (PFS). El análisis primario de la PFS demostró una media de PFS de 16,0 meses en el brazo de quimioterapia (CP) en comparación con 18,3 meses en el brazo de quimioterapia más bevacizumab (CPB7.5+) con un valor p (Prueba de Rango Logarítmico) de 0,0010. La relación de riesgo (HR) (95% CI) fue de 0,79 (0,68; 0,91). La diferencia fue significativa., El análisis de la PFS está resumido en las figuras 9 y 10.

Las características de base fueron las siguientes:

Tabla 4:

Características de base – Demografía

	CP (N=764)	CPB7.5+ (N=764)
Edad en años: Media (SD)	56,7 (10,6)	56,5 (10,4)
Raza: Blanco (%)	737 (96%)	730 (96%)
Estado de actividad (ECOG)		
0 (%)	333 (44%)	307 (41%)
1 (%)	375 (49%)	391 (52%)
2 (%)	54 (7%)	55 (7%)

Tabla 5:

Características de base – Historia de Cáncer ovárico

	CP (N=764)	CPB7.5+ (N=764)
Origen del Cáncer		
Ovario (Epitelial) (%)	667 (87%)	673 (88%)
Trompa de Falopio (%)	29 (4%)	27 (4%)
Peritoneal Primario (%)	56 (7%)	50 (7%)

Múltiples ubicaciones (%)	12 (2%)	14 (2%)
Estadíos FIGO		
I (%)	65 (8%)	54 (7%)
II (%)	80 (11%)	83 (11%)
III (%)	522 (68%)	523 (68%)
IV (%)	97 (13%)	104 (14%)

Tabla 6:
Características de base – Historia de Cáncer ovárico

	CP (N=764)	CPB7.5+ (N=764)
Grado de diferenciación		
Grado 1 (%)	56 (7%)	41 (5%)
Grado 2 (%)	142 (19%)	175 (23%)
Grado 3 (%)	556 (74%)	538 (71%)
Subtipo Histológico		
Serosas (%)	529 (69%)	525 (69%)
Mucinosas (%)	15 (2%)	19 (2%)
Endometroides (%)	57 (7%)	60 (8%)
Células claras (%)	60 (8%)	67 (9%)
Otras (%)	55 (7%)	53 (7%)
Mixed (%)	48 (6%)	40 (5%)

Tabla 7:
Características de base – Cirugía de Cáncer ovárico

	CP (N=764)	CPB7.5+ (N=764)
Cirugía citorreductora practicada: Si (%)	747 (98%)	751 (98%)
Resultado de la cirugía citorreductora: Óptimo (%)	552 (74%)	559 (74%)
Tiempo entre la cirugía y el primer tratamiento del ensayo [días]: Media (SD)	35,6 (10,2)	35,9 (9,9)

La evaluación preliminar de eventos adversos correspondientes al bevacizumab fue consistente con los estudios anteriores.

Tabla 8: Reseña General de los Eventos Adversos (AEs)

	CP (N=763)	CPB7,5+ (N=746)
Ptes c. EA Graves	154 (20,2%)	279 (37,4%)
Ptes c. EA Grado 3/4/5	385 (50,5%)	479 (64,2%)
Ptes que inter. algún tratamiento debido	98 (12,8%)	293 (39,3%)
Ptes que inter. algún tratamiento debido a EA	68 (8,9%)	162 (21,7%)
Todas las Muertes	131 (17,2%)	107 (14,3%)
Todas las Muertes Relacionadas	1 (0,1%)	5 (0,7%)
Muertes no debidas al Progreso	16 (2,1%)	19 (2,5%)

Ejemplo 3. Estudio multicéntrico aleatorizado ciego, con control de placebo en fase iii de carboplatino y gemcitabina más bevacizumab en pacientes con carcinoma ovárico, peritoneal primario o trompas de falopio recurrente sensible al platino

El carcinoma epitelial ovárico (EOC) y sus equivalentes histológicos y clínicos, el carcinoma peritoneal primario (PPC) y el carcinoma de trompas de faloipo se producen con una incidencia de aproximadamente 25.000 casos por año en los Estados Unidos y son responsables por aproximadamente 14,000 muertes por año. Dado que la enfermedad tiende a ser asintomática en los estadíos tempranos, la mayoría de las pacientes preentan inicialmente la enfermedad avanzada (Estadío III o IV). Pese a la sensibilidad del EOC, PPC y el carcinoma de trompas de falopio a un número de agentes quimioterapéuticos, especialmente los taxanos y los compuestos de planino, sólo 20%–30% de las pacientes que presentan la enfermead en Estadío III o IV sobrevive a los 5 años. Las pacientes con cáncer recurrente sensible al platino (definido como recurrencia de la enfermedad más de 6 meses después de completado un régimen de quimioterapia basada en platino) tienen tasas de respuesta iniciales más elevadas a la quimioterapia; sin embargo, estas pacientes no se consideran curables. Recientemente, la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos aprobó la quimioterapia de gemcitabine en combinación con carboplatino para la enfermedad sensible al platino con recaída. El carboplatino y gemcitabina dieron lugar a una sobrevida sin progreso estadísticamente significativa (PFS) en comparación con el carboplatino solo en pacientes con enfermedad sensible al platino. Ver, por ej., Pfisterer, Plante M, Vergote I, et al. *Gemcitabine plus*

Carboplatino compared with carboplatino in pacientes con platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: an intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG and the EORTC GCG. J. Clin Oncol, 2006;24:4699-707.

La angiogénesis parece ser un factor importante tanto en el desarrollo como en el progreso posterior del EOC. Yoneda y colegas (1998) demostraron, en un modelo de xenoinjerto de EOC, que esas tasas de crecimiento de los tumores eran directamente proporcionales a la densidad vascular y que el desarrollo de ascitis maligna, una característica asociada a una mala consecuencia del EOC estaba asociado a la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Ver, por ej., Yoneda J, Kuniyasu H, Crispens MA, et al. *Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice.* J. Natl Cancer Inst. 1998 Mar 18;90:447-54. Otros estudios han demostrado la asociación de la expresión de VEGF en el EOC con densidad microvascular. Más aun, los estudios han demostrado que la densidad de expresión de CD31 (un marcador del endotelio vascular) por inmunohistoquímica en el EOC se correlaciona inversamente con la supervivencia.

Este ejemplo describe un estudio multicéntrico aleatorizado con control de placebo en Fase III que evalúa la eficacia y seguridad del bevacizumab (15 mg/kg, Día 1, cada 21 días), administrado en combinación con carboplatino (área bajo la curva [AUC] 4, Día 1, cada 21 días) con gemcitabina (1000 mg/m², Día 1 y Día 8, cada 21 días) en mujeres con carcinoma epitelial ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio recurrente, sensible al platino. Aproximadamente 480 pacientes se inscribieron en un período de aproximadamente 2,5 años. Las pacientes fueron asignadas aleatoriamente a carboplatino y gemcitabina con placebo versus carboplatino y gemcitabina con bevacizumab. Además, al momento de la aleatorización, los pacientes fueron estratificados según la enfermedad sensible al platino (recurrencia 6-12 meses del último tratamiento con base de platino versus recurrencia >12 meses desde el último tratamiento con base de platino) y cirugía citorreductora para el cáncer epitelial ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio recurrente (con cirugía practicada vs. sin cirugía).

Pacientes	484 mujeres asignadas aleatoriamente 1:1 a uno de dos brazos de tratamiento:		
		Fase A (ciclos 1–6; ciclo = tres semanas)	Fase B (hasta el progreso de la enfermedad = tres semanas)
	Brazo 1	Quimioterapia+ placebo	Placebo
	Brazo 2	Avastin + quimioterapia	Avastin

El estudio consistió en los dos brazos expuestos a continuación, Ver también la **figura 11**.

Brazo 1: Quimioterapias con carboplatino (AUC 4 IV) y gemcitabina (1000mg/m2) (6 ciclos hasta 20 ciclos) seguida por placebo

- Brazo 2: Avastin (15mg/kg durante 6 ciclos hasta 10 ciclos) en combinación con quimioterapias con carboplatino y gemcitabine (6 ciclos hasta 10 ciclos) seguidas por el uso continuado de Avastin (15 mg/kg) solo hasta el progreso de la enfermedad

Se calculó la dosis de carboplatino para alcanzar una AUC objetivo de concentración x tiempo de acuerdo con la fórmula de Calvert con el uso de una relación de filtración glomerular (GFR); por ej., para los fines de la presente, se considera que la GFR es equivalente al clearance de creatinina. Fórmula de Calvert para la Dosificación de Carboplatino (AUC)

dosis total (mg) = AUC objetivo (en mg/ml/minuto) x [GFR (en ml/minuto) ÷ 25]

El clearance de creatinina se puede calcular de acuerdo con los lineamientos institucionales.

Selección de Pacientes

Las pacientes con carcinoma epitelial del ovario, PPC o carcinoma de trompas de falopio que ha recurrido > 6 meses desde la quimioterapia basada en platino (primera recurrencia) son aptas para ingresar en este estudio. A continuación se enumeran los criterios de inclusión y exclusión específicos adicionales.

Criterios de Inclusión de Pacientes:

Las pacientes deben reunir los siguientes criterios para ser aptas para ingresar al estudio:

- Haber firmado un formulario de Consentimiento Informado
- Edad ≥ 18 años
- Carcinoma ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio que ha

recurrido > 6 meses después de la quimioterapia basada en platino

- La paciente debe tener carcinoma epitelial ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio recurrente. Esta debe ser la primera recurrencia del carcinoma epitelial ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio.
 - Los ejemplos de tipos histológicos de células incluyen: tipos histológicos de células epiteliales son aptas para la admisión: adenocarcinoma seroso, adenocarcinoma endometroide, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma no diferenciado, adenocarcinoma de células caras, carcinoma de células transicionales, Tumor maligno de Brenner o adenocarcinoma no especificado de otra manera
- Ninguna quimioterapia anterior en la situación de recurrencia
- Enfermedad mensurable de acuerdo con RECIST modificado con por lo menos una lesión que se puede medir con precisión en por lo menos una dimensión (dimensión más larga registrada)
- Cada lesión mensurable debe ser de 20 mm medida por técnicas convencionales, CT e imágenes de resonancia magnética (MRI) o de 10 mm si se la mide por CT en espiral.
- Más de 28 días transcurridos desde y ya recuperada de la terapia radiante o cirugía anterior
- Estado de actividad ECOG 0 o 1
- Uso de medios efectivos de anticoncepción (en el caso de mujeres con potencial de embarazo)
- Capacidad para cumplir con los procedimientos de estudio y seguimiento

Criterios de Exclusión de Pacientes

Las pacientes que cumplen alguno de los siguientes criterios serán excluidas del estudio.

- Exclusiones Específicas por la Enfermedad
 - Tratamiento de quimioterapia anterior para el carcinoma ovárico, peritoneal primario o de trompas de falopio recurrente: la terapia hormonal (es decir, progesteronas, estrógenos, anti estrógenos, inhibidores de la aromatasa) no se considera régimen de quimioterapia anterior. La terapia concomitante anti-neoplásica anti-hormonal (que incluye tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa, etc.) no está permitida para las pacientes que participan en el tratamiento del estudio. Se puede administrar una

terapia de reemplazo hormonal (HRT) en bajas dosis (fisiológicas) de estrógeno.

- Historia de fístula abdominal, perforación gastrointestinal o absceso intraabdominal
- Pacientes con síntomas o signos clínicos de obstrucción GI o que requieren hidratación parenteral, nutrición parenteral o alimentación por sonda
- Pacientes con evidencia de aire libre abdominal no explicado por paracentesis ni procedimiento quirúrgico reciente
- Exclusiones Médicas Generales
 - Expectativa de vida de < 12 semanas
 - Participación en curso, reciente (dentro de las 4 semanas del Día 1, Ciclo 1) o planeada en un estudio con drogas experimentales
 - Valores Clínicos de Laboratorio de Análisis
 - Recuento de granulocitos <1500/ μ l
 - Recuento de plaquetas < 100.000/ μ l
 - Hemoglobina < 8,5 g/dl (la hemoglobina puede estar sostenida por transfusión o eritropoyetina u otros factores de crecimiento hematopoyéticos aprobados)
 - Bilirrubina sérica > 2,0 x límites superiores de la normal (ULN)
 - Fosfatasa alcalina, aspartato transaminasa (AST), y/o alanina transaminasa (ALT) > 2,5 x ULN (AST, ALT > 5 x ULN en el caso de pacientes con metástasis hepática)
 - Creatinina sérica $\geq$ 1,6
 - Relación normalizada internacional (INR) > 1,5 y/o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) > 1,5 x ULN (excepto por las pacientes que reciben terapia anticoagulante)
 - En el caso de pacientes con warfarina de dosis completa, INR en rango (habitualmente entre 2 y 3) y un PTT <1,2 veces la ULN
 - Historia de otras malignidades dentro de los 5 años del Día 1, Ciclo 1, excepto en el caso de tumores con riesgo ínfimo de metástasis o muerte, como el carcinoma de células basales adecuadamente controlado o el carcinoma de células escamosas de la piel o

carcinoma in situ del cuello del útero

- Cualquier otra enfermedad, disfunción metabólica, hallazgo en examen físico o hallazgo de laboratorio que produzca una sospecha razonable de enfermedad o condición que contraindique el uso de una droga de investigación o que pueda afectar la interpretación de los resultados o poner a la paciente en alto riesgo de complicaciones del tratamiento
- Exclusiones Específicas del Bevacizumab
 - Historia de uso de bevacizumab sistémico (Avastin®) u otro VEGF u otro agente dirigido a receptor VEGF
 - Hipertensión inadecuadamente controlada (definida como presión sanguínea sistólica > 150 mmHg y/o presión sanguínea diastólica > 100 mmHg con medicaciones antihipertensivas)
 - Historia anterior de crisis hipertensivas o encefalopatía hipertensiva
 - CHF Clase II o superior según New York Heart Association
 - Historia de infarto de miocardio o angina inestable dentro de los 6 meses anteriores al Día 1, Ciclo 1 (día de la primera infusión de bevacizumab/placebo)
 - Historia de ACV o TIA dentro de los 6 meses anteriores a la matriculación en el estudio
 - Enfermedad conocida del SNC excepto por metástasis cerebrales tratadas
 - Las metástasis cerebrales tratadas se definen como sin evidencia de progreso o hemorragia después del tratamiento y sin necesidad actual de dexametasona, determinada mediante examen clínico e imágenes del cerebro (MRI o CT) durante el período de clasificación. Estas metástasis no deben estar situadas en el tallo cerebral, el cerebro medio, el puente, la médula o la leptomeninges. El tratamiento de las metástasis cerebrales puede incluir la radioterapia del cerebro completo (WBRT), radiocirugía (Cuchillo Gamma, LINAC o equivalente) o una combinación según lo que el médico tratante considere adecuado. Las pacientes con metástasis del SNC tratadas por resección neuroquirúrgica o biopsia cerebral

realizada dentro de los 3 meses anteriores al Día 1 serán excluidas.

- Historia de enfermedad vascular significativa (por ej., aneurisma aórtico, disección aórtica)
- Trombosis arterial periférica reciente dentro de los 6 meses anteriores al Día 1, Ciclo 1
- Historia de hemoptisis ($\geq 1/2$ cucharada de té de sangre rojo vivo por episodio) dentro de 1 mes anterior al Día 1, Ciclo 1
- Evidencia de diátesis sangrante o coagulopatía significativa (en ausencia de anticoagulación terapéutica)
- Procedimiento de cirugía mayor, biopsia abierta o lesión traumática de consideración dentro de los 28 días anteriores al Día 1, Ciclo 1 o estimación de la necesidad de un procedimiento de cirugía mayor durante el curso del estudio
- Biopsia de núcleo u otro procedimiento quirúrgico mayor, excluyendo la colocación de un dispositivo de acceso vascular, dentro de los 7 días anteriores al Día 1, Ciclo 1
- Herida grave sin cicatrización, úlcera activa o fractura ósea sin tratar
- Proteinuria en el análisis, según demostrado por UPCR de $\geq 1,0$ en el análisis
- Hipersensibilidad conocida a cualquier componente del bevacizumab
- Embarazo (prueba de embarazo positiva) o lactancia
- Las pacientes con potencial de embarazo deben utilizar un medio de anticoncepción eficaz.

Este estudio, OCEANS, enroló una población diferente de pacientes de la del ejemplo 1 (GOG 0218) y el ejemplo 2 (ICON7); en este estudio pudieron ingresar las mujeres con cáncer ovárico sensible al platino con tratamiento anterior. Las mujeres con cáncer ovárico pueden recibir una quimioterapia con base de platino como primera línea de tratamiento. El tiempo entre que recibe la última dosis de quimioterapia basada en platino y el regreso (recurrencia) de la enfermedad se utiliza para ayudar a determinar la elección de la quimioterapia usada en la siguiente línea de tratamiento. Las mujeres tienen cáncer ovárico “sensible al platino” si la enfermedad regresa más de seis meses después de

completar la quimioterapia inicial basada en platino. El cáncer ovárico se considera “resistente al platino” si regresa después dentro de los seis meses de completarse la quimioterapia inicial basada en platino.

RESULTADOS

Este estudio de fase II de bevacizumab más quimioterapia en mujeres con cáncer ovárico cumplió su punto final primario. El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia y seguridad de la adición de bevacizumab a la quimioterapia standard seguida por el uso prolongado de bevacizumab solo hasta el progreso de la enfermedad, en comparación con la quimioterapia sola, en mujeres previamente tratadas con cáncer ovárico. El estudio demostró que bevacizumab más quimioterapia, seguida por el uso continuado de bevacizumab solo hasta el progreso de la enfermedad incrementaba el tiempo de vida de las mujeres con cáncer ovárico (recurrente) con tratamiento anterior sensible al platino sin empeoramiento de la enfermedad (sobrevida sin progreso o PFS), en comparación con quimioterapia sola. La PFS se define como tiempo desde la aleatorización hasta el progreso de la enfermedad según determinación realizada por el investigador o la muerte debida a cualquier causa, lo que ocurra primero. Los investigadores del estudio evaluaron el punto final primario de PFS. La enfermedad mensurable fue evaluada por los investigadores utilizando RECIST Modificados (Therasse et al. 2000), por ej., cada 9 semanas durante todo el curso del estudio. Ver , *por ej.*, Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauser EA, et al. *New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors.* J Natl Cancer Inst 2000;92:205–1. Los puntos finales secundarios incluyeron la supervivencia total (OS), la tasa de respuesta, la duración de la respuesta y la seguridad. No se observaron nuevos hallazgos sobre seguridad y los eventos adversos fueron consistentes con los observados en los ensayos pivotaes anteriores del bevacizumab.

Listado de Secuencias

<110> GENENTECH, INC. y F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, et al.

<120> TERAPIA ANTI-ANGIOGENESIS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER
OVÁRICO

<130> P4411R1

<141> 2011-02-22

<150> US 61/439,819

<151> 04-02-2011

<150> US 61/360.059

<151> 30-06-2010

<150> US 61/351.231

<151> 03-06-2010

<150> US 61/307.095

<151> 23-02-2010

<160> 2

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser

20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg

REIVINDICACIONES

1. Un método de tratamiento de una paciente con diagnóstico de cáncer ovárico, que comprende someter a la paciente a un régimen de tratamiento que combina una quimioterapia con la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF seguido por terapia de mantenimiento con 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 prolonga con eficacia la sobrevida sin progreso de la paciente.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el agente quimioterapéutico es taxano, paclitaxel, docetaxel, partículas unidas a la proteína paclitaxel (por ej., Abraxane®), análogo de platino, carboplatino, gemcitabina o combinaciones de los mismos.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la quimioterapia del régimen de tratamiento comprende la administración de taxano y carboplatino.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la quimioterapia del régimen de tratamiento comprende la administración de carboplatino y gemcitabina.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el la paciente tiene diagnóstico de cáncer ovárico anteriormente sin tratamiento.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la paciente tiene diagnóstico de cáncer ovárico recurrente.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual dicho anticuerpo anti-VEGF se une al mismo epítotope que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo humanizado.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo A4.6.1 humanizado o un fragmento del mismo.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab y la quimioterapia del régimen de tratamiento comprende la administración de capecitabina y paclitaxel o docetaxel.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab y la quimioterapia del régimen de tratamiento comprende la administración de carboplatino y gemcitabina.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la sobrevida sin progreso de la paciente se prolonga por lo menos aproximadamente 3,8 mes o más en comparación con otra paciente no tratada con la terapia de mantenimiento con anti-VEGF.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 8, 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
HYYGSSHWYF DVWGQGTLVT VSS (SEC ID NO. 1)

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

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

15. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el paclitaxel es administrado de acuerdo con la figura 1 o la figura 2.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el carboplatino es administrado de acuerdo con la figura 1 o la figura 2 o la figura 11.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el docetaxel es administrado de acuerdo con la figura 1.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual la gemcitabina es administrado de acuerdo con la figura 11.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el anti-VEGF es administrado de acuerdo con el brazo III de la figura 1 o la figura 2 o de acuerdo con el brazo II del Ejemplo 3.

20. Un kit para tratar el cáncer ovárico sin tratamiento anterior en una paciente humana, que comprende un envase que comprende una composición de anticuerpo anti-VEGF e instrucciones para usar la composición de anticuerpo anti-VEGF en combinación con terapia de taxano y carboplatino seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF, donde las instrucciones indican que la sobrevida sin progreso para las pacientes que reciben terapia de taxano y terapia

de carboplatino terapia y bevacizumab es de 14,1 meses con una relación de riesgo de 0,717 (valor $p < 0,0001$).

21. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20, 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 PGKGGLEWVGW
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWYF DWVGQGTLVT VSS (SEC ID No. 1)

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

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

22. El kit de acuerdo con la reivindicación 20, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

23. El kit de acuerdo con la reivindicación 20, en el cual la paciente tiene cáncer ovárico en Estadío III o IV.

24. Un método para instruir a una sujeto humana con cáncer ovárico, método que comprende ofrecer instrucciones para recibir tratamiento para el cáncer ovárico con un anticuerpo anti-VEGF concomitante con quimioterapia seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF a fin de prolongar la sobrevida sin progreso de la paciente.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el cual las instrucciones comprenden además instrucciones para recibir tratamiento con por lo menos dos agentes quimioterapéuticos.

26. Un método de promoción que comprende promover la administración de un anticuerpo anti-VEGF concomitante con quimioterapia seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF para el tratamiento de cáncer ovárico en una sujeto humana a fin de prolongar la sobrevida sin progreso de la paciente.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el cual el método comprende además promover la administración de por lo menos dos agentes quimioterapéuticos.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el cual la promoción se realiza mediante un prospecto, donde el prospecto presenta instrucciones para recibir tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF.

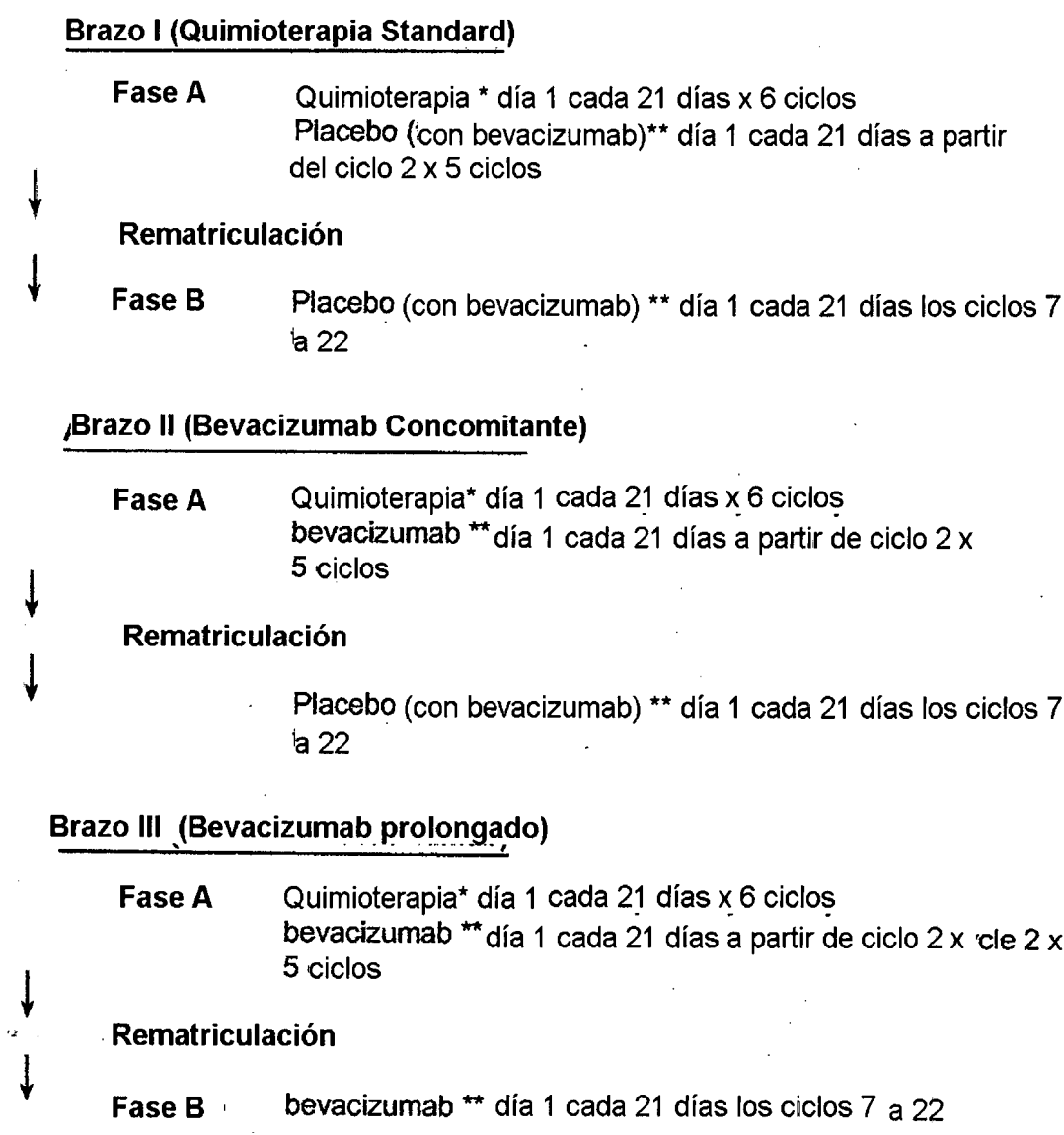
29. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el cual la promoción se realiza mediante un prospecto que acompaña a una formulación comercial del anticuerpo anti-VEGF.
30. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el cual la promoción se realiza mediante un prospecto que acompaña a una formulación comercial de los agentes quimioterapéuticos.
31. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el cual la promoción se realiza mediante comunicación escrita a un médico o profesional de la salud.
32. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el cual la promoción se realiza mediante comunicación oral a un médico o profesional de la salud.
33. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el cual la promoción va seguida por el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF y los agentes quimioterapéuticos seguidos por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.
34. Un método comercial, que comprende la comercialización de una terapia con anticuerpo anti-VEGF concomitante con quimioterapia seguida por terapia de mantenimiento con anti-VEGF para el tratamiento de cáncer ovárico en una sujeto humana a fin de prolongar la sobrevida sin progreso de la paciente.
35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en el cual a la comercialización sigue el tratamiento de la sujeto con el anticuerpo anti-VEGF concomitante con quimioterapia seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF.
36. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24, 26 o 34, en el cual el agente quimioterapéutico es taxano, paclitaxel, docetaxel, partículas unidas a la proteína paclitaxel (por ej., Abraxane®), análogo de platino, carboplatino, gemcitabina o combinaciones de los mismos.
37. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24–36, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
38. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la quimioterapia del régimen de tratamiento comprende la administración de paclitaxel y carboplatino.
39. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab y la quimioterapia del régimen de tratamiento comprende la administración de paclitaxel y carboplatino.
40. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la sobrevida sin progreso de la paciente se prolonga por lo menos aproximadamente 2,3 meses o más en comparación con otra paciente no tratada con el anticuerpo anti-VEGF.

41. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el paclitaxel es administrado de acuerdo con la figura 8.
42. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el carboplatino es administrado de acuerdo con la figura 8.
43. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el anticuerpo anti-VEGF es administrado como en e brazo B de la figura 8.
44. Un kit para tratar el cáncer ovárico sin tratamiento anterior en una paciente humana, que comprende un envase que contiene una composición de anticuerpo anti-VEGF e instrucciones para usar la composición del anticuerpo anti-VEGF en combinación con paclitaxel y carboplatino seguido por terapia de mantenimiento con anti-VEGF, donde las instrucciones indican que la sobrevida sin progreso en el caso de pacientes que reciben paclitaxel, carboplatino y anticuerpo anti-VEGF es de 18,3 meses con una relación de riesgo de 0,79.

RESUMEN

La presente invención se refiere, en general, al tratamiento de enfermedades y trastornos patológicos con anticuerpos anti-VEGF. Más específicamente, la invención se relaciona con el tratamiento de pacientes humanas susceptibles o con diagnóstico de cáncer utilizando un anticuerpo anti-VEGF, preferentemente en combinación con uno o más agentes terapéuticos antitumorales para el tratamiento del cáncer ovárico.

Aleatorización (Ciclo = 21 días)



*Paclitaxel 175mg/m² IV en 3 horas seguido por Carboplatino AUC 6 IV en 30 minutos día 1 de los ciclos 1 a 6 solamente. (Nota: docetaxel 75mg/m² IV en 1 hora ser sustituido por paclitaxel)

**bevacizumab / Placebo 15mg/kg IV día 1 de cada ciclo a partir del ciclo 2

FIG. 1

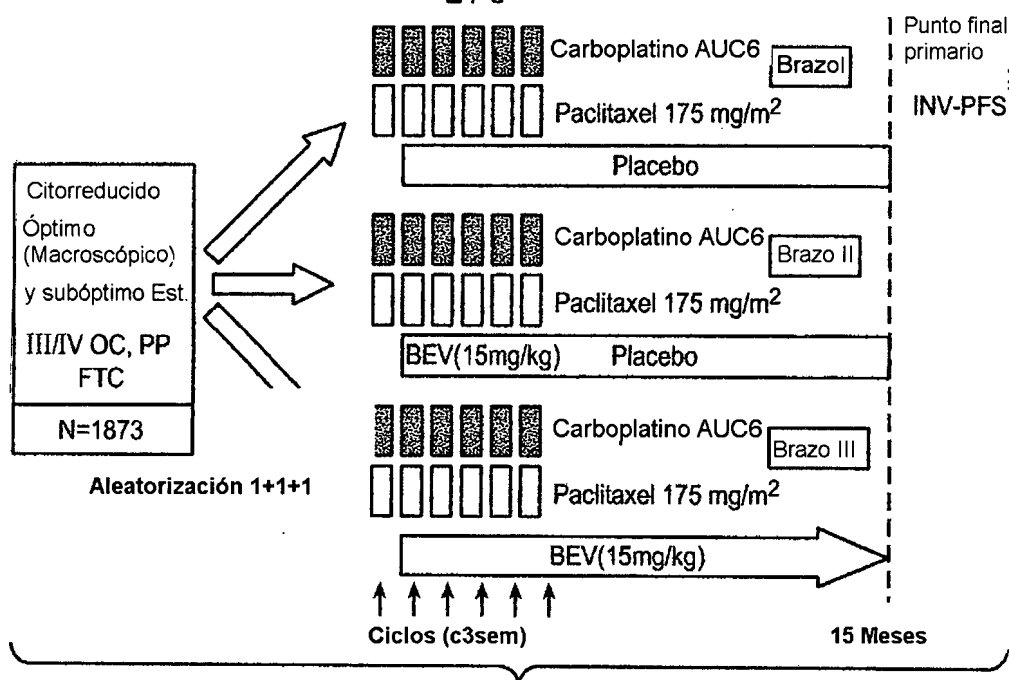


FIG. 2

Selección de Eventos Adversos
Aparición entre ciclo 2 y 30 días después de la fecha del último tratamiento

Evento Adverso (Grado cuando limitado), n (%)	Brazo I CP (n=601)	Brazo II CP + BEV (n=607)	Brazo III CP + BEV → BEV (n=608)
Eventos GI ^a (grado ≥2)	7 (1.2)	17 (2.8)	16 (2.6)
Hipertensión (grado ≥3)	10 (1.7) ^b	36 (5.9) ^b	63 (10.4) ^b
Proteinuria (grado ≥3)	4 (0.7)	4 (0.7)	10 (1.6)
Dolor(grad. ≥3)	55 (9.2) ^b	73 (12.0) ^b	83 (13.7) ^b
Neutropenia (grado ≥4)	347 (57.7)	384 (63.3)	385 (63.3)
Neutropenia febril	21 (3.5)	30 (4.9)	26 (4.3)
Evento tromboembólico venoso	35 (5.8)	32 (5.3)	41 (6.7)
Evento tromboembólico arterial	5 (0.8)	4 (0.7)	4 (0.7)
Sangrado del SNC	0	0	2 (0.3)
Sangrado no SNC (grado ≥3)	5 (0.8)	8 (1.3)	13 (2.1)
RPLS	0	1 (0.2)	1 (0.2)

RPLS = síndrome de leucoencefalopatía posterior reversible

^aPerforación/fistula/necrosis/fuga

^bp<0.05

FIG. 3

Selección de Eventos Adversos por Fase de Tratamiento

Selección Eventos adversos, n Grado si limitado Paciente, n Ciclos, n	Brazo I CP		Brazo II CP + BEV		Brazo III CP + BEV → BEV	
	(n=601)	(n=483)	(n=607)	(n=457)	(n=608)	(n=464)
	Citotóxico (Ciclos 2-6)	Mantenimiento (Ciclos ≥7)	Citotóxico (Ciclos 2-6)	Mantenimiento (Ciclos ≥7)	Citotóxico (Ciclos 2-6)	Mantenimiento (Ciclos ≥7)
Fase de tratamiento ^a						
Eventos GI ^b (grado ≥2)	6	1	16	1	15	1
Hipertensión (grado ≥3)	3	7	24	12	25	38
Proteinuria (grado ≥3)	2	2	4	0	0	10
Dolor (grad. ≥3)	28	23	42	31	46	37
Neutropenia (grado ≥4)	345	2	382	2	385	0
Neutropenia febril	21	0	30	0	26	0
Evento tromboembólico venoso	26	9	27	5	27	14
Evento tromboembólico arterial	4	1	1	3	3	1
Sangrado SNC	0	0	0	0	0	2
Sangrado no SNC (grado ≥3)	3	2	8	0	10	3
RPLS	0	0	1	0	0	1

^aAparece dentro 30 días último tratamiento

^aPerforación/fistula/necrosis/fuga

FIG. 4

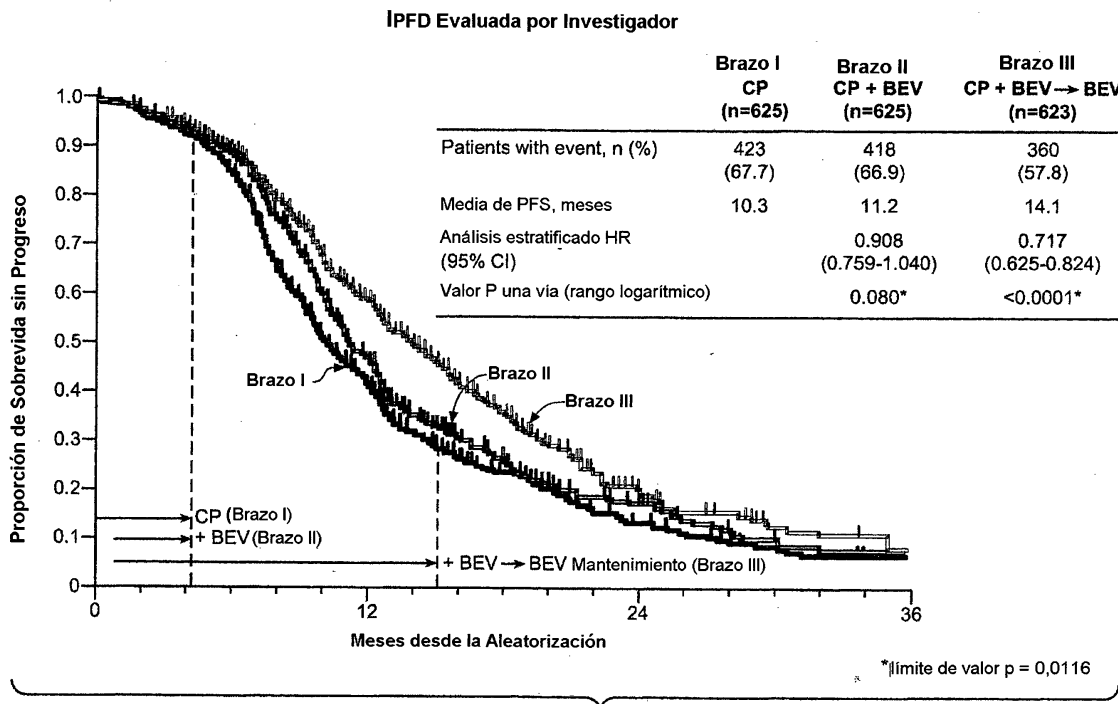


FIG. 5

Ramificaciones del uso deCA-125 como determinante del Progreso

	Análisis de PFS definido x protocolo	Análisis de CA-125 c/censura
PFS Media, meses		
CP (Brazo I)	10.3	12.0
CP + BEV → BEV (Brazo II)	14.1	18.0
Diferencia absoluta en PFS media, meses	3.8	6.0
Relación de riesgo	0.717	0.645
Censura para CA-125, %		
CP (Brazo I)	0	20
CP + BEV → BEV (Brazo III)	0	29

FIG. 6

Análisis de Subgrupos

CP + BEV → BEV (Brazo III) vs CP (Brazo I)

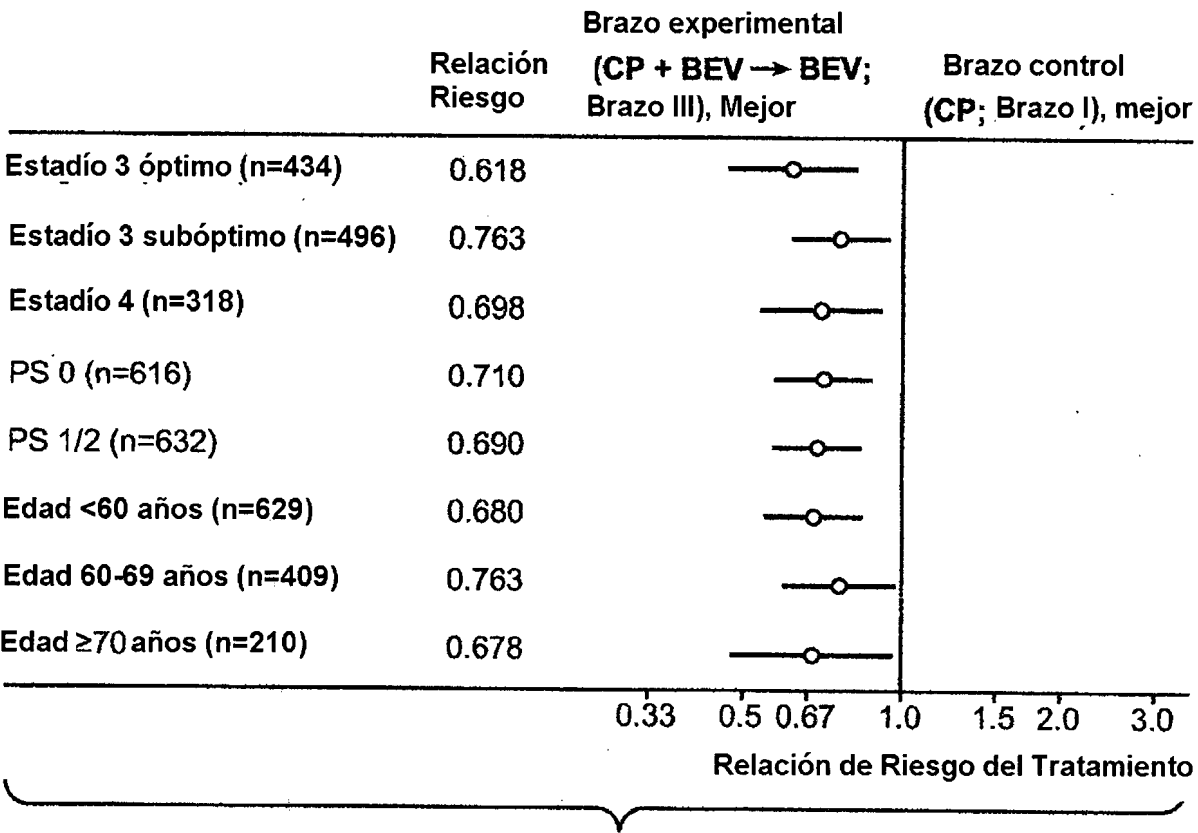
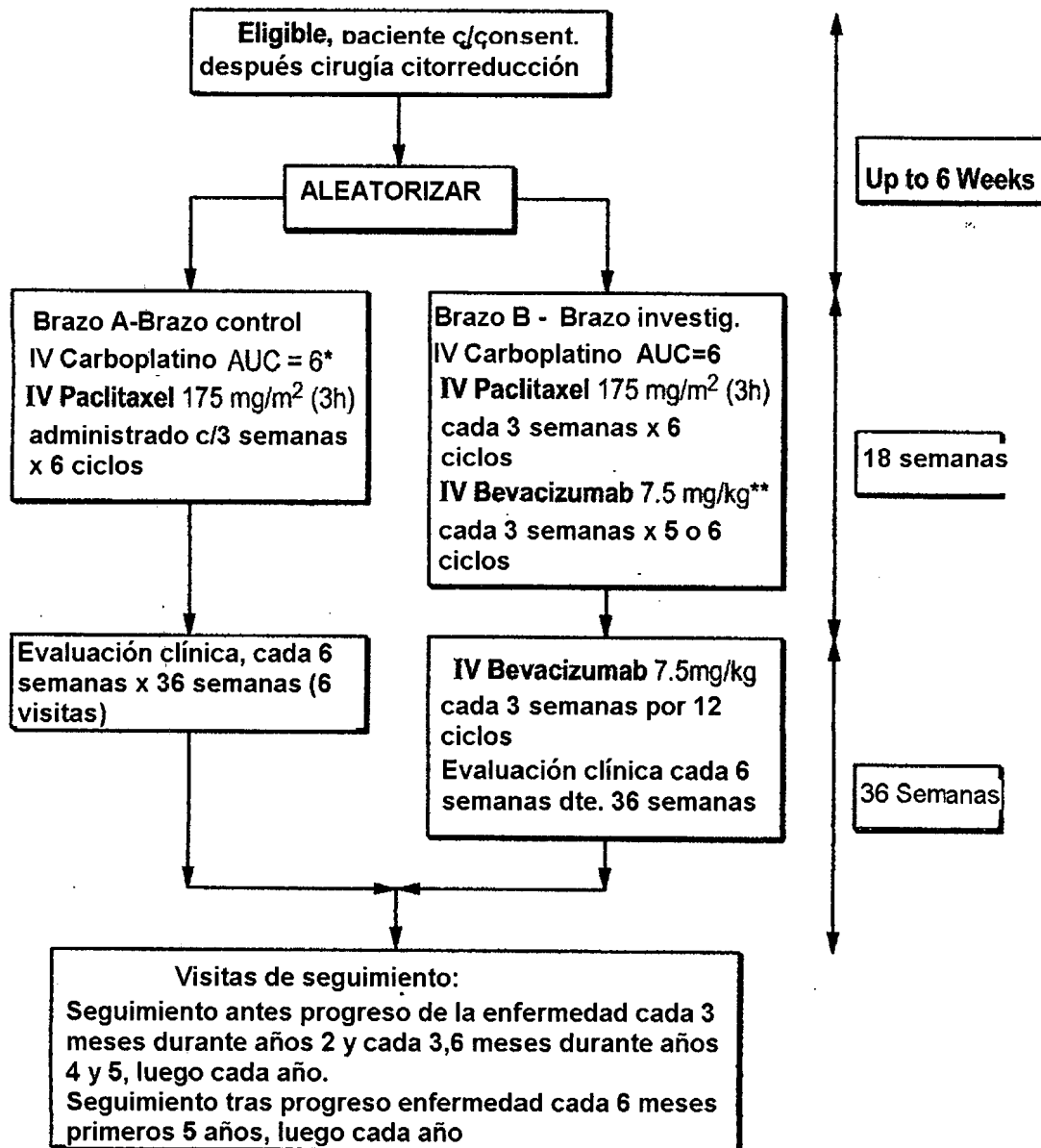


FIG. 7

1. ESQUEMA DE ENSAYO

Esquema de ensayo ICON7



*La dosis de carboplatino recomendada p/ ICON7 es AUC6 (a menos que se predetermine que esa diferente por grupo GCIG individual)

**Bevacizumab puede ser omitido en el primer ciclo si se debe iniciar quimioterapia dentro de las 4 semanas de la cirugía

FIG. 8

Análisis de PFS para Ensayo ICON7

	CP (N=764)	CPB7.5+ (N=764)
Pacientes con eventos	392 (51.3 %)	367 (48.0 %)
Pacientes sin eventos	372 (48.7 %)	397 (52.0 %)
Tiempo hasta evento (meses)		
Mediana#	16.0	18.3
95% CI para Mediana #	[14.3;17.3]	[17.8;19.1]
Rango##	0.0 to 32.9	0.0 to 32.9
Valor p (prueba rango logarítmico)	0.0010*	
Relación de Riesgo	0.79	
95% CI	[0.68;0.91]	

FIG. 9

Esquema del Estudio

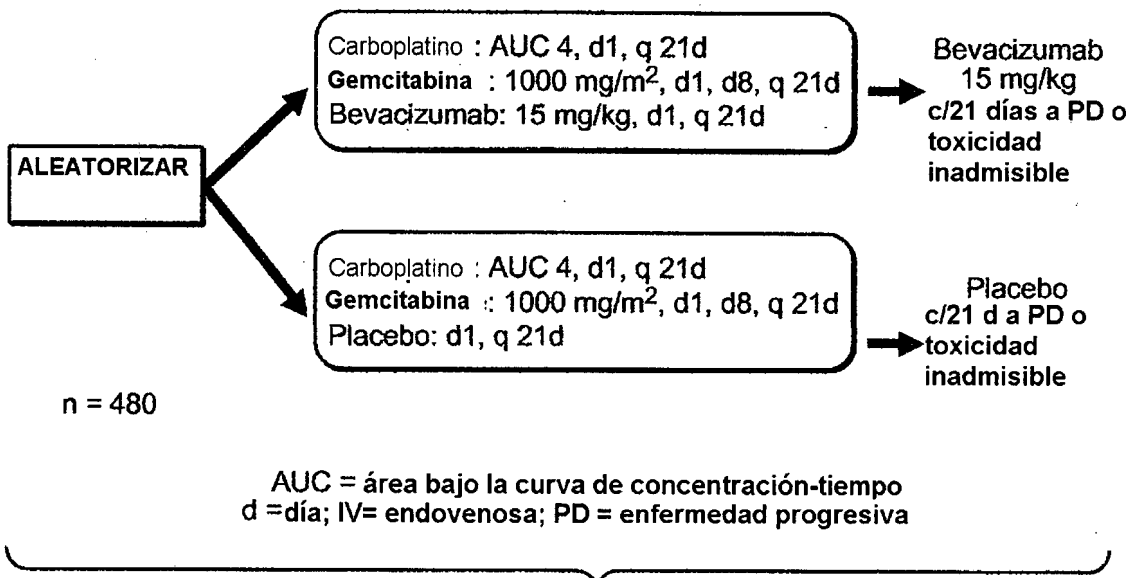


FIG. 11

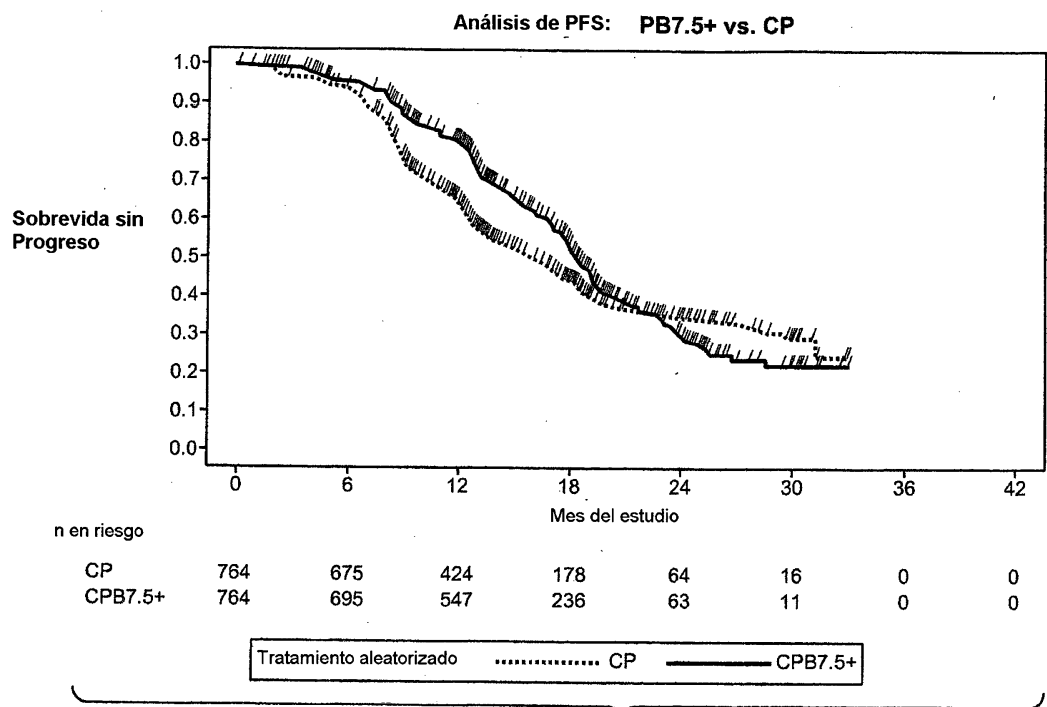


FIG. 10

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

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

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

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

Otorgado y firmado en

hoy de de 200

Firma

Nombre

Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

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

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

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

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

South San Francisco, California, USA

Granted and signed in

this 6th day of December 2005

Signature 
Name **Timothy R. Schwartz, Ph.D.**
Title **Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.**

AUTHORIZATION

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

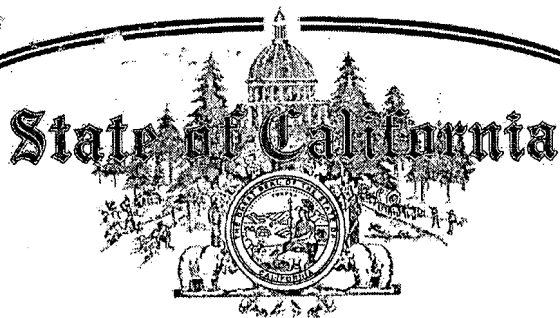
August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

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

10:77:00



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

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

10. Signature



James McChesney

Secretary of State

[Signature]



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo

} ss.

On December 6, 2005

before me,

Aida Mielat Guian

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

personally appeared

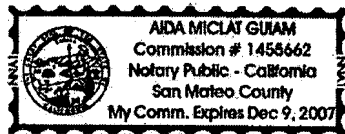
Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Aida Mielat Guian
Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____

Number of Pages: _____

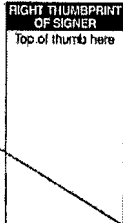
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

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

Signer is Representing: _____



93 33

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

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

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

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

CERTIFICADO

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

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado

RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

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

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

☐ a quien conozco personalmente

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

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

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

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

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

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

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

Nombre del firmante: _____

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

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí

AUTORIZACION

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

27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.

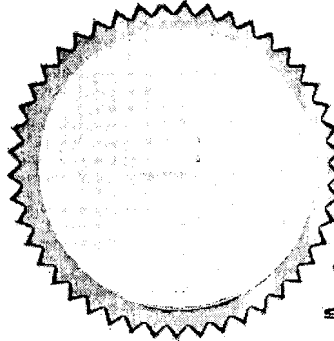
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

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



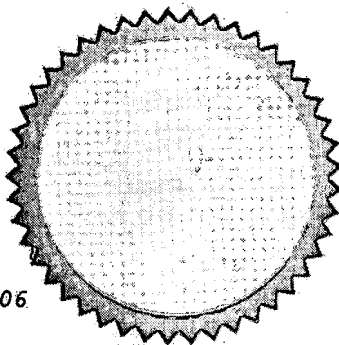
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

Delaware

PAGE 1

The First State

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



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

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

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

ARTICLE I

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

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

ARTICLE 3

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

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

ARTICLE 4

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

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

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

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

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE 5

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

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

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

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

ARTICLE 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE 7

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

ARTICLE 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. 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 PRÉSENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.

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

FECHA: 05 - 24 - 05

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

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

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

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

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

ARTICULO 3

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

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación 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 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 del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

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

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

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

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

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, 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 término, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

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

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

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

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

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

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

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

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

SECCION 8.05. *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (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 u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

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

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

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

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

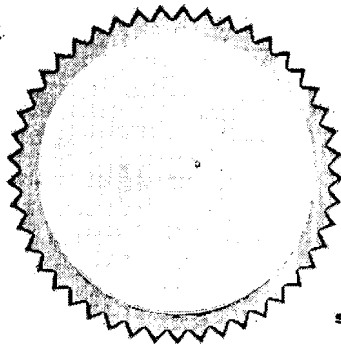
Apostille

(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:



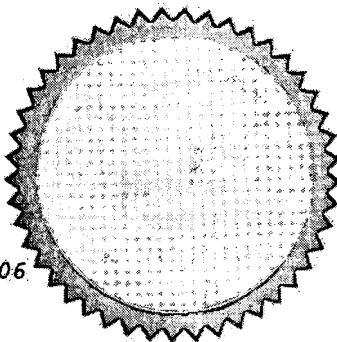
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

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: 3900385

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

By: Stephen 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. 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 enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

10. 11. 2005
3/4

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

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



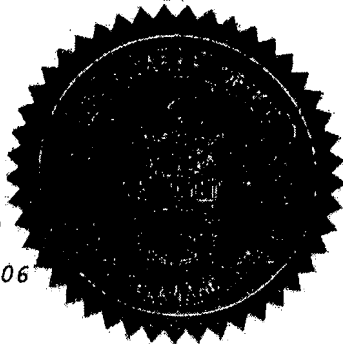
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

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 SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

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.

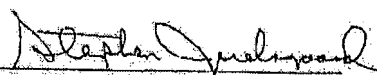
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

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:



Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel
 and Secretary

#153087

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

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

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

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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

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

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

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

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

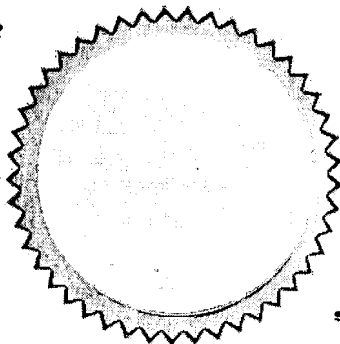
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

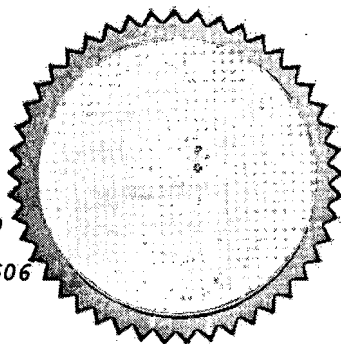
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

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: 3900386

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

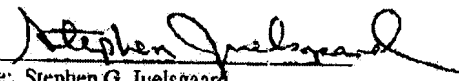
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares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

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

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

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

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

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

APOSTILLA

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

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

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 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: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

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

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

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

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



Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), **F. HOFFMANN-LAROCHE AG**

I (We), **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**

domiciliado(s) en Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Suiza,

Domiciled Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland,

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseññas, lemas comerciales, nombres comerciales, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio y/o dirección; 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 CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO**, 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, slogans 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, domicile and address 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 CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4, 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 appoint **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciled in Carrera 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **Basel**

16 October 2009

Otorgado y firmado en

Signature 
Name **Ulrike Heiroth** **Susanne Amann**
Title **Vice Director** **Mandatory**

hoy de de 200_

Firma

NOTARIAL CERTIFICATE

I hereby certify that **F. Hoffmann-La Roche AG** is a legally constituted society, which exists under the laws of Switzerland and that

Miss **Dr. Ulrike Hildegard Heiroth**, German citizen, residing in Kaiseraugst (Switzerland), and

Miss **Susanne Amann**, German citizen, residing in Heitersheim (Germany),

are authorized to sign and act for and in the name of the society.

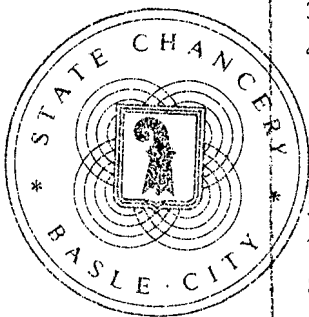
The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

B a s e l (Switzerland), this 16th (sixteenth) day of October 2009 (two thousand and nine).



Dr. Christoph Nertz

AP 168/2009



APOSTILLE (Hague Convention of October 5 th , 1961)	
1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)	
This official document	
2. is signed by	<i>Dr. jur. Chr. Nertz</i>
3. in his/her function as	<i>notary public</i>
4. and certified by the seal of the	<i>above mentioned</i>
Certified	
5. in Basel (Bâle)	6. on <i>19. Okt. 2009</i>
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. no. <i>7269/14221</i>	
9. Seal/stamp:	10. Signature: <i>[Signature]</i>
	Helena Schaffner

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de **PODER** otorgado por **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**, con domicilio en Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Suiza.

CERTIFICADO NOTARIAL

Por la presente certifico que **F. Hoffmann-La Roche AG** es una sociedad legalmente constituida, existente bajo las leyes de Suiza y que

la señorita **Dra. Ulrike Hildegard Heirot**, ciudadana alemana, residente en Kaiseraugst (Suiza), y

la señorita **Susanne Amann**, ciudadana alemana, residente en Heitersheim (Alemania),

están autorizadas para firmar y actuar para y a nombre de dicha sociedad.

El suscrito Notario Público da fe de haber visto los documentos que comprueban la existencia de la compañía.

Basel (Suiza), este 16 de octubre de 2009.

(firma)

Hay un sello que dice:
DR. CHRISTOP NERTZ
Notario, Basel

AP 168/2009

APOSTILLA

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

1. País: Suiza

El presente acto público

2. Ha sido firmado por DR. CHRISTOP NERTZ

3. Actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/timbre de EL MENCIONADO ARRIBA

Certificado

5. En Basel

6. el 19 de octubre de 2009

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. No. 7269/14221

9. Sello

10. Firma:

(firma)
Helena Schaffner

Hay un sello que dice:
CANCELLERÍA DE ESTADO
CIUDAD DE BASLE

121591

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0063056	
				Bogotá D.C., Junio 21 de 2012 - 16:38:47	
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.				NI 860.047.372	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	23138	05/03/2012		370.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23139	05/03/2012		370.000.00
RECIBO DE CA	999999999	31892	29/03/2012		370.000.00
RECIBO DE CA	999999999	31893	29/03/2012		370.000.00
RECIBO DE CA	999999999	31895	29/03/2012		370.000.00
RECIBO DE CA	999999999	31896	29/03/2012		370.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN			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. 12-129535- -00000-0000					
Fecha: 2012-08-01 16:10:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 411 PRESENTACION Folios: 152					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Junio 21 de 2012 - 16:38:50					

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

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0075869
		Bogotá D.C., Julio 26 de 2012 - 10:30:18

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	452410092	26/07/2012	8.520.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
54 60005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	1.020.000.00
			\$1.020.000.00
			=====

SON: **UN MILL&OACUTE;N VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-129535- -00000-0000

Fecha: 2012-08-01 16:10:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 152

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE U

☐ 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 ☐