

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-046084-A-00000-0000

Fecha: 2012-10-26 17:56:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 369 193

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 08-46084A

54. TÍTULO _____

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____

DOMICILIO _____

74. APODERADO _____

22. BOGOTÁ, D. C., _____

PETITORIO

AS: 107.001



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-046084-A-00000-0000

Fecha: 2012-10-26 17:56:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 369

193

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

8 Junio 2008

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.

ver folio 372



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco,
California 94080, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-mail

IDENTIFICACIÓN

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

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4,
Bogotá, Colombia.Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐Cual _____
Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Ryan J. WATTS, Yan WU.

Dirección: [US/US]; 524 Yale Drive, San Mateo, California 94402, US; 1160 Blythe Street,
Foster City, California 94404, US (Respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente).

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/043516
Publicación Internacional No. WO 2007/056470 A3Fecha 08-11-2006
Fecha 18-05-2007

6 Título (54): ANTAGONISTAS DE NEUROPILINA

7 Clasificación Internacional (51): C07K16/28

8 Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

08-11-2005

60/734,798

US

27-07-2006

60/820,561

9 Comprobante de pago No. 08-17,977

Fecha 07-05-2008

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

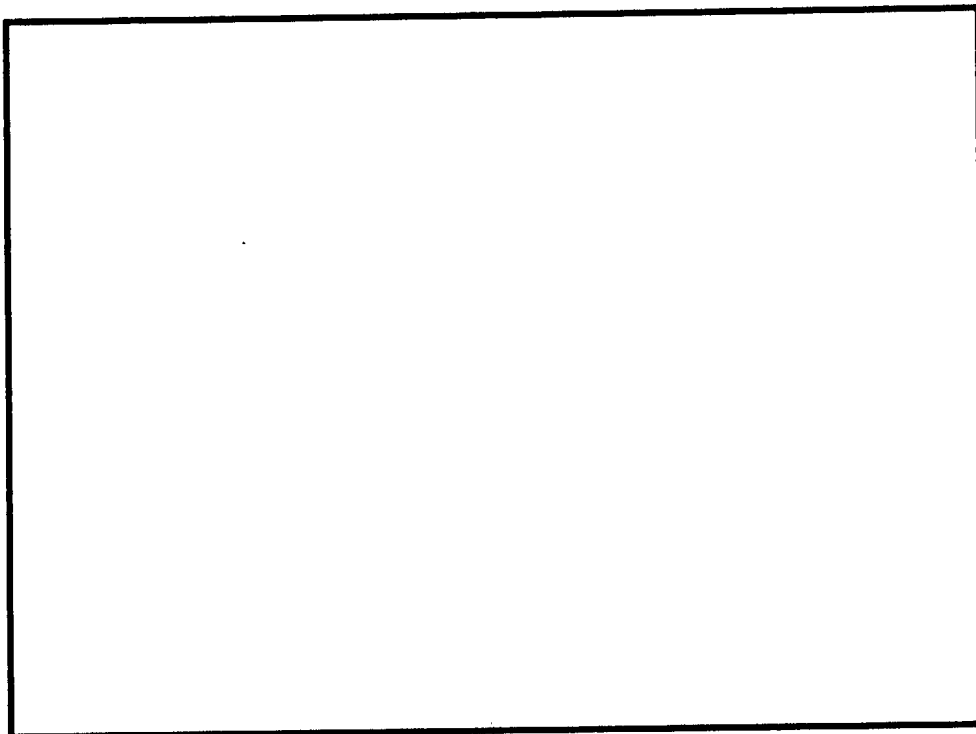
2

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 501.000
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros Tarjeta de Propietarios
Documentos PCT
Listado de Secuencias

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12. Solicito la concesión de la patente:

NOMBRE: JUAN PABLO GADENA SARMIENTO

FIRMA

[Firma manuscrita]
C.C. 80.410.337 de Usaquén, TP 57492 del C.S.J.

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

2

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

As 107001
3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-046084-00000-0000

Fecha: 2008-05-07 16:12:57 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 369

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-046084-A-00000-0000

Fecha: 2012-10-26 17:56:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

LIBRO OFICIAL DE CAJA : 08 - 17,977
FECHA : FEBRERO 28 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	3535362	28/02/2008	23,935,600.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

8

A



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Reservado para el adhesivo de radicación

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-046084-A-00000-0000

Fecha: 2012-10-26 17:56:57
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 369

10

193

AS. 122.294

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

GENENTECH, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	1 DNA Way, CA 94080	South San Francisco
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

80.410.337

57492

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Ciudad
Calle 70 A #4-41	Bogotá, D.C.
Dirección electrónica	No. Fax
	742-2200
	Número telefónico
	744-2200

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

2
5/11

4. Datos del trámite		
CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 08 046.084	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

5. Anexos
Comprobante de pago No. <u>12-91333</u> Fecha: <u>24.09.2012</u>

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división.
☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud.
☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

7. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO	
C.C 80.410.337	Tarjeta Profesional 57492

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



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0091333

Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2012 - 17:16:21

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	91267	05/09/2012		13.700.400.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	447749610	04/09/2012	39.404.600.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRÁMITES 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. 08-046084-00010-0000

Fecha: 2012-10-23 15:46:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 199

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-046084-A-00000-0000

Fecha: 2012-10-26 17:56:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

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

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

Septiembre 5 de 2012 - 17:16:32

Handwritten signature or initials in the top right corner.

ANTAGONISTAS DE NEUROPILINA

Esta solicitud es una solicitud no provisional que reivindica prioridad bajo 35 USC 119(e) a los números de solicitud provisional 60/734,798 presentada el 8 de noviembre de 2005 y 60/820,561, presentada el 27 de julio de 2006, cuyo contenido total se incorpora aquí por referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente a composiciones y métodos asociados con actividades de la neuropilina (NRP). Más particularmente, la invención pertenece a composiciones y métodos para modular la formación y el mantenimiento vasculares mediados por el receptor neuropilina-1 (NRP1). Esta invención se refiere además a métodos para la identificación sistemática de sustancias terapéuticamente útiles para prevenir o tratar afecciones y enfermedades asociadas con angiogénesis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El desarrollo de un sistema vascular es un requisito fundamental para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Tejidos que crecen activamente tales como embriones y tumores requieren un suministro sanguíneo adecuado. Satisfacen esta necesidad produciendo factores pro-angiogénicos, que promueven la formación y mantenimiento de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso conocido generalmente como angiogénesis. La formación vascular es un acontecimiento complejo pero ordenadamente biológico que involucra todos o muchos de los siguientes pasos: a) Las células endoteliales (ECs) proliferan a partir de ECs existentes o se diferencian de células progenitoras; b) las ECs migran y confluyen para formar estructuras en forma de cordones; c) los cordones vasculares experimentan entonces tubulogénesis para formar vasos con una luz ("***lumen***") central d) los cordones existentes o vasos echan brotes para formar vasos secundarios; e) plexus vasculares primitivos experimentan una remodelación y reconfiguración posterior; y f) células peri-endoteliales se seleccionan para revestir los tubos endoteliales, que proporcionan funciones de mantenimiento y modulación a los vasos; tales células, incluidos pericitos para capilares pequeños, células de músculo liso para vasos más grandes, y células del

5
109
8

miocardio en el corazón. Hanahan, D. *Science* 277:48-50 (1997); Hogan, B. L. & Kolodziej, P.A. *Nature Reviews Genetics*. 3:513-23 (2002); Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. *Cell*. 112:19-28 (2003).

En la actualidad se halla bien establecido que la angiogénesis está implicada en la patogénesis de una variedad de trastornos. Éstos incluyen tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolenticular, hemangiomas, inflamación crónica, neovascularopatías intraoculares tales como retinopatías proliferativas, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), glaucoma neovascular, rechazo inmunitario de tejido corneal transplantado y otros tejidos, artritis reumatoide, y psoriasis. Folkman et al., *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934 (1992); Klagsbrant et al., *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-239 (1991); and Garner A., "Vascular diseases", In: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

En el caso de crecimiento de un tumor, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia, y para aportar los nutrientes necesarios para el crecimiento y metástasis del tumor. Folkman *et al.*, *Nature* 339:58 (1989). La neovascularización permite que las células del tumor adquieran una ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa, comparadas con las células normales. Usualmente un tumor comienza con una sola célula aberrante que puede proliferar únicamente a un tamaño de unos cuantos milímetros cúbicos, debido a la distancia de lechos capilares disponibles, y puede permanecer 'latente' sin crecimiento y diseminación adicionales durante un período prolongado de tiempo. Algunas células neoplásicas cambian luego al fenotipo angiogénico para activar células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos recién formados no sólo permiten un crecimiento continuado del tumor primario, sino también la diseminación y re-colonización de células neoplásicas metastásicas. En consecuencia, se ha observado una correlación entre densidad de microvasos en secciones del tumor y supervivencia del paciente en cáncer de mama, sí como en varios otros tumores. Weidner et al., *N. Engl. J. Med* 324: 1-6 (1991); Horak et al., *Lancet* 340:1120-1124 (1992); Macchiarini et al., *Lancet* 340:145-146 (1992). Los mecanismos precisos que controlan el interruptor angiogénico ("**the angiogenic switch**") no se entienden bien todavía, pero se cree que la neovascularización de

6
15
9

la masa del tumor resulta del balance neto de una multitud de estimuladores e inhibidores de angiogénesis (Folkman, 1995, *Nat Med* 1(1):27-31).

El proceso de desarrollo vascular está estrechamente regulado. A la fecha, se ha demostrado que un número significativo de moléculas, factores mayormente segregados, producidos por células circundantes, regulan la diferenciación, proliferación, migración y confluencia de EC en estructuras en forma de cordones. Por ejemplo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se ha identificado como el factor clave implicado en estimular la angiogénesis y en inducir la permeabilidad vascular. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997). El descubrimiento de que la pérdida de incluso un solo alelo VEGF resulta en mortalidad embrionaria apunta a un papel insustituible ejercido por este factor en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular. Más aún, se ha demostrado que el VEGF es un mediador clave de neovascularización asociado con tumores y trastornos intraoculares. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev. supra.* El ARNm VEGF se sobreexpresa por la mayoría de tumores humanos examinados. Berkman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:153-159 (1993); Brown *et al.*, *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown *et al.*, *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern *et al.*, *Brit. J. Cancer* 73:931-934 (1996); Dvorak *et al.*, *Am. J. Pathol.* 146:1029-1039 (1995).

Además, los niveles de concentración de VEGF en fluidos oculares se correlacionan en altísima medida con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatías diabéticas y otras relacionadas con isquemia. Aiello *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 331:1480-1487 (1994). Más aún, estudios han demostrado la localización de VEGF en membranas neovasculares coroideas en pacientes afectados por AMD. López *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:855-868 (1996).

Anticuerpos que neutralizan anti-VEGF suprimen el crecimiento de una variedad de líneas celulares de tumores humanos en ratones atímicos (Kim *et al.*, *Nature* 362:841-844 (1993); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:1789-1797 (1995); Borgström *et al.*, *Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, *Cancer Res.* 56:921-924 (1996)) e inhiben además la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos retinianos isquémicos. Adamis *et al.*, *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996). Por lo tanto, anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros inhibidores de la acción de VEGF son candidatos promisorios para el tratamiento de tumores y

varios trastornos neovasculares intraoculares. Tales anticuerpos se describen, por ejemplo, en EP 817,648 publicada el 14 de enero de 1998; y en WO98/45331 y WO98/45332, ambas publicadas el 15 de octubre de 1998. Uno de los anticuerpos anti-VEGF, bevacizumab, ha sido aprobado por la FDA para uso en combinación con un régimen de quimioterapia para tratar cáncer colorrectal metastásico (CRC) y cáncer pulmonar amicrocítico (NSCLC). Además, el bevacizumab se está investigando en muchos estudios clínicos en curso para tratar varias indicaciones de cáncer.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, las neuronas generan axones en forma de cables que migran a grandes distancias con el fin de alcanzar sus dianas. Véase la reseña por Carmeliet and Tessier-Lavigne (2005) *Nature* 436:193-200. En el ápice principal de un axón en crecimiento se encuentra una estructura sensorial de alta motilidad llamada cono de crecimiento. A través de ciclos dinámicos de extensión y retracción de extensiones filopodiales, el cono de crecimiento detecta continuamente y evalúa un sinnúmero de indicios guía en su entorno espacial, y selecciona con precisión una ruta correcta para extenderse hacia su diana final.

Durante la última década, se ha hecho un progreso considerable en entender los mecanismos de orientación de los axones. Véase la reseña por Dickson (2002) *Science* 298:1959-64. Los indicios guía vienen en cuatro variedades: atrayentes y repelentes; que pueden actuar bien a corta distancia (es decir, asociados con la matriz o células) o bien a larga distancia (es decir, diseminables). Hasta el momento, se han identificado cuatro familias principales de moléculas de orientación de axones: las netrinas, semaforinas, efrinas y slits. Véase la reseña por Huber et al (2003) *Annu Rev Neurosci* 26:509-63.

Las semaforinas (Sema), también llamadas colapsinas, pertenecen a una gran familia de proteínas segregadas y asociadas a membrana, filogenéticamente conservadas. Miembros de la familia de semaforinas son capaces de mediar los episodios de orientación de axones tanto de repulsión como de atracción durante el desarrollo neuronal. Raper (2000) *Curr Opin Neurobiol* 10:88-94. Todas las más de treinta semaforinas identificadas hasta la fecha comparten un dominio Sema N-terminal conservado de alrededor de 500 aminoácidos. Los miembros de las semaforinas se clasifican en ocho subfamilias dependiendo de sus similitudes estructurales y especies de origen. Para mayores detalles sobre la nomenclatura

unificada para las semaforinas, véase Semaphorin Nomenclature Committee (1999) *Cell* 97:551-552.

La familia de neuropilinas (NRP) consta de dos proteínas homólogas, neuropilina-1 (NRP1) y neuropilina-2 (NRP2). La NRP1 se identificó por primera vez como una glucoproteína transmembrana 130-kDa tipo I expresada en conos de crecimiento de axones en desarrollo. La NRP2 se identificó posteriormente mediante clonación de expresión. Fujisawa and Kitsukawa (1998) *Curr Opin Neurobiol* 8:587-592. Se descubrió que las NRPs son receptores para un subconjunto de semaforinas, las semaforinas clase 3. Se sugirió que las NRPs funcionan como co-receptores no señalizadores junto con otra familia de receptores de semaforinas, las plexinas.

Aunque inicialmente descritas como mediadores de la orientación de axones, se ha descubierto también que las NRPs juegan papeles críticos en el desarrollo vascular. Carmeliet and Tessier-Lavigne (2005). Se identifica como un receptor VEGF específico de isoforma expresado en células neoplásicas y endoteliales, que exige esfuerzos considerables para entender el papel de las NRPs en la biología vascular y tumoral. Soker et al (1998) *Cell* 92:735-745; Klagsbrun et al (2002) *Adv Exp Med Biol* 515:33-48. Estudios genéticos han aportado una sólida evidencia de que la *Nrp1* se requiere para morfogénesis vascular. La pérdida de la función *Nrp1* resulta en remodelación vascular y defectos de ramificación, un fenotipo que puede intensificarse aún más por la pérdida de la función *Nrp2*. Kawasaki et al. (1999) *Development* 126:4895-4902; Takashima et al. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3657-3662. Estos resultados sugieren que en una etapa temprana en el desarrollo *Nrp1* y *Nrp2* pueden tener funciones traslapantes.

No obstante, la expresión de cada *Nrp* se subdivide posteriormente en el desarrollo, expresándose *Nrp1* primariamente en arterias, y *Nrp2* en venas y vasos linfáticos. Yuan et al (2002) *Development* 129:4797- 4806; Herzog et al. (2001) *Mech Dev* 109: 115-119. En especial, la pérdida de la función *Nrp1* sola deteriora específicamente el desarrollo linfático.

Como *Nrp1* se expresa en muchos otros tipos de células durante el desarrollo, se abordó el papel de la *Nrp1* vascular mediante la generación de una

9
18
12

inactivación específica de EC, que resultó en defectos vasculares similares a los observados en el alelo *null*. Gu et al. (2003) *Dev Cell* 5:45-57. Es interesante advertir que este estudio demostró asimismo que la unión de Sema3A a NRP1 no se requiere para el desarrollo vascular. En otro estudio, se observaron defectos en la orientación de células del ápice endotelial en el cerebelo en desarrollo en embriones con inactivación de *Nrp1*. Gerhardt et al. (2004) *Dev Dyn* 231:503-509.

A pesar de estudios extensivos sobre el papel de NRP1 en el desarrollo vascular, sigue siendo poco claro si NRP1 ejerce su función vascular exclusivamente mediante la vía Receptor 2 VEGF-VEGF (VEGFR2), como un potenciador para la unión VEGF a VEGFR2 y, así, para la señalización VEGFR2, o mediante una vía señalizadora independiente de VEGFR2, o una combinación de los dos.

Los anticuerpos monoclonales pueden fabricarse empleando tecnología de ADN recombinante. Se ha hecho un uso ampliamente difundido de anticuerpos monoclonales, particularmente los derivados de roedores; no obstante, con frecuencia los anticuerpos no humanos son antigénicos en humanos. El arte ha tratado de superar este problema construyendo anticuerpos "quiméricos" en los cuales un dominio de unión a antígeno no humano se acopla a un dominio constante humano (Cabilly et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567). El isotipo del dominio constante humano puede seleccionarse para hacer a la medida el anticuerpo quimérico para participación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y la citotoxicidad dependiente de complemento. En un esfuerzo más por resolver las funciones de unión a antígeno de anticuerpos y minimizar el uso de secuencias heterólogas en anticuerpos humanos, se han generado anticuerpos humanizados para varios antígenos en los cuales sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido en regiones por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Por ejemplo, se han sustituido residuos de roedor para los segmentos correspondientes de un anticuerpo humano. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) y posiblemente algunos residuos de la región base (FR) se sustituyen por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor. Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525;

10
14
13

Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536.

Antes de administrar un anticuerpo terapéutico a un humano, son deseables por lo general estudios preclínicos en mamíferos no humanos para evaluar la eficacia y/o la toxicidad del anticuerpo. De manera ideal, los anticuerpos sujetos a estos estudios son capaces de reconocer y reaccionar con gran potencia frente a un antígeno diana endógeno al animal hospedero tal un ratón o primate no humano.

La tecnología de exposición en bacteriófagos ha proporcionado una poderosa herramienta para generar y seleccionar proteínas novedosas que se unen a un ligando, tal como un antígeno. Usando la técnica de exposición en bacteriófagos, pueden generarse grandes bibliotecas de variantes de proteína y clasificarse rápidamente para aquellas secuencias que se unen a un antígeno diana con alta afinidad. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de variante se fusionan a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un cápside vírico, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas de exposición en bacteriófagos monovalentes donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína o polipéptido se fusiona a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una porción de la proteína del gen III. (Bass, S. (1990) *Proteins* 8:309; Lowman and Wells (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 3:205). En un sistema de exposición en bacteriófagos monovalentes, la fusión del gen se expresa a bajos niveles y se expresan igualmente proteínas del gen III tipo natural de modo que se conserva la infectividad de las partículas. Métodos de generar bibliotecas de péptidos e identificar sistemáticamente esas bibliotecas se han divulgado en muchas patentes (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,723,286, Patente de los Estados Unidos No. 5,432, 018, Patente de los Estados Unidos No. 5,580,717, Patente de los Estados Unidos No. 5,427,908 y Patente de los Estados Unidos No. 5,498,530).

La demostración de la expresión de péptidos en la superficie de bacteriófagos filamentosos y la expresión de fragmentos de anticuerpos funcionales en el periplasma de *E. coli* fue importante en el desarrollo de bibliotecas de exposición en bacteriófagos de anticuerpos. (Smith et al. (1985)

Science 228:1315; Skerra and Plückthun (1988) *Science* 240:1038). Bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de unión a antígeno se han preparado en un número de modos incluidos alterar un gen único insertando secuencias de ADN aleatorias o clonar una familia de genes relacionados. Métodos de exponer anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que utilizan exposición en bacteriófagos se han descrito en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108, 6,172,197, 5,580,717, y 5,658,727. La biblioteca se detecta sistemáticamente entonces con respecto a la expresión de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno con características deseadas.

La tecnología de exposición en bacteriófagos posee varias ventajas sobre los métodos de hibridoma convencionales y métodos recombinantes para preparar anticuerpos con las características deseadas. Esta tecnología permite el desarrollo de grandes bibliotecas de anticuerpos con diversas secuencias en menos tiempo y sin el empleo de animales. La preparación de hibridomas o la preparación de anticuerpos humanizados pueden requerir fácilmente varios meses de preparación. Adicionalmente, puesto que no se requiere inmunización, bibliotecas de anticuerpos en bacteriófagos pueden generarse para antígenos que son tóxicos o tienen baja antigenicidad (Hogenboom (1988) *Immunotechniques* 4:1-20). Las bibliotecas de anticuerpos en bacteriófagos pueden usarse igualmente para generar e identificar anticuerpos terapéuticos novedosos.

Bibliotecas de exposición en bacteriófagos se han utilizado para generar anticuerpos humanos de humanos inmunizados, no inmunizados, secuencias de líneas germinativas, o repertorios Ig de linfocitos B vírgenes (Barbas & Burton(1996) *Trends Biotech* 14:230; Griffiths et al. (1994) *EMBO J.* 13:3245; Vaughan et al. (1996) *Nat Biotech.* 14:309; Winter EP 0368 684 B 1). Bibliotecas de unión a antígeno [de linfocitos B] vírgenes, o no inmunitarios se han generado usando una variedad de tejidos linfoides. Algunas de estas bibliotecas se encuentran disponibles en el comercio, tales como las desarrolladas por Cambridge Antibody Technology and Morphosys (Vaughan et al. (1996) *Nature Biotech* 14:309; Knappik et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 296:57). Sin embargo, muchas de estas bibliotecas poseen una diversidad limitada.

La capacidad de identificar y aislar anticuerpos de alta afinidad de una biblioteca de exposición en bacteriófagos es importante en aislar anticuerpos

novedosos para empleo terapéutico. El aislamiento de anticuerpos de alta afinidad de la biblioteca depende del tamaño de la biblioteca, la eficiencia de la producción en células bacterianas y la diversidad de la biblioteca. Véase, por ejemplo, Knappik et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 296:57. El tamaño de la biblioteca disminuye por la ineficiencia de la producción debida a un plegamiento inadecuado del anticuerpo o proteína de unión a antígeno y la presencia de codones de terminación. La expresión en células bacterianas pueden inhibirse si el anticuerpo o dominio de unión a antígeno no se pliega apropiadamente. La expresión puede mejorarse mutando residuos por turnos en la superficie de la interfase variable/constante, o en residuos CDR seleccionados. (Deng et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9533, Ulrich et al. (1995) *PNAS*, 92:11907-11911; Forsberg et al. (1997) *J. Biol. Chem* 272:12430). La secuencia de la región base es un factor en permitir el plegamiento apropiado cuando se producen bibliotecas de exposición en bacteriófagos de anticuerpos en células bacterianas.

Generar una biblioteca diversa de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno es también importante para el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad. Bibliotecas con diversificación en CDRs limitadas se han generado en una variedad de métodos. Véase, por ejemplo, Tomlinson (2000) *Nature Biotech.* 18:989-994. Las regiones CDR3 son de interés, en parte porque a menudo se encuentra que participan en la unión a antígeno. Las regiones CDR3 en la cadena pesada varían en gran medida en tamaño, secuencia y conformación estructural.

Otros han generado también diversidad aleatorizando regiones CDR de las cadenas pesadas y ligeras variables usando todos los 20 aminoácidos en cada posición. Se consideró que usar todos los 20 aminoácidos resultaría en una gran diversidad de secuencias de anticuerpos de variante e incrementaría la posibilidad de identificar anticuerpos novedosos. (Barbas (1994) *PNAS* 91:3809; Yelton, DE (1995) *J. Immunology* 155:1994; Jackson, J.R. (1995) *J. Immunology* 154:3310 and Hawkins, RE (1992) *J. Mol. Biology* 226:889).

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención provee anticuerpos anti-NRP1 novedosos capaces de modular por lo menos una actividad biológica mediada por neuropilina. Preferiblemente, los anticuerpos anti-NRP1 son anticuerpos antagonistas capaces

17
20
16

de inhibir por lo menos una actividad biológica mediada por neuropilina. Más específicamente, la presente invención provee métodos de generar anticuerpos anti-NRP1 de una biblioteca de bacteriófagos de anticuerpos sintéticos humanos diseñados, y anticuerpos anti-NRP1 novedosos que bloquean la función, generados de la misma. Los anticuerpos anti-NRP1 de la invención caen dentro de dos clases, dependiendo de dónde se unen a NRP1: anticuerpos anti-NRP1^A (incluidos YW64.3 y sus variantes) son aquellos que se unen a los dominios CUB (a1a2) de NRP1; y anticuerpos anti-NRP1^B (incluidos YW107.4 y sus variantes) son aquellos que se unen a los dominios de los factores V/VIII de coagulación (b1b2) de NRP1.

En un aspecto, los anticuerpos anti-NRP1^A de la invención pueden seleccionarse de los clones de anticuerpo "YW64" como se muestra en la Tabla III, que tienen las secuencias CDR parciales identificadas y afinidades de unión a NRP1s murinas y humanas. El anticuerpo anti-NRP1^A de la invención contiene preferiblemente un dominio variable de cadena ligera que incluye las siguientes secuencias de aminoácidos CDR: CDRL1 (RASQSISSYLA; SEQ ID NO:123), CDRL2 (GASSRAS; SEQ ID NO:124) y CDRL3 (QQYMSVPIT; SEQ ID NO: 125). Por ejemplo, el anticuerpo anti-NRP1^A contiene una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:3. El anticuerpo anti-NRP1^A de la invención contiene preferiblemente un dominio variable de cadena pesada que incluye las siguientes secuencias de aminoácidos CDR: CDRH1 (GFSFSSEPIIS; SEQ ID NO: 126), CDRH2 (SSITGKNGYTTYADSVKG; SEQ ID NO: 127) y CDRH3 (WGKKVYGMDV; SEQ ID NO: 128). Por ejemplo, el anticuerpo anti-NRP1^A contiene una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-NRP1^A de la invención es el anticuerpo YW64.3 que contiene una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 3 y una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-NRP1^B de la invención pueden seleccionarse de los clones del anticuerpo "YW107.4" como se muestra en la Tabla IV, que tienen secuencias CDR parciales identificadas y afinidades de unión a NRP1s murinas y humanas. El anticuerpo anti-NRP1^B de la invención contiene preferiblemente un dominio variable de cadena ligera que incluye las siguientes secuencias de aminoácidos CDR: CDRL1 (RASQYFSSYLA; SEQ ID NO: 129),

17
23

CDRL2 (GASSRAS; SEQ ID NO: 130) y CDRL3 (QQYLGSPPT; SEQ ID NO: 131). Por ejemplo, el anticuerpo anti-NRP1^B contiene una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:5. El anticuerpo anti-NRP1^B de la invención contiene preferiblemente un dominio variable de cadena pesada que incluye las siguientes secuencias de aminoácidos CDR: CDRH1 (GFTFSSYAMS; SEQ ID NO: 132), CDRH2 (SQISPAGGYTNYADSVKG; SEQ ID NO: 133) y CDRH3 (ELPYRMSKVMDV; SEQ ID NO: 134). Por ejemplo, el anticuerpo anti-NRP1^B contiene una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:6. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-NRP1^B de la invención es el anticuerpo YW107.4.87 que contiene una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:5 y una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:6.

También contempla la presente invención usos de anticuerpos anti-NRP1 para tratar trastornos asociados con angiogénesis tales como cáncer. En una incorporación, los anticuerpos anti-NRP1 de la invención se emplean en combinación con un anticuerpo anti-VEGF. Preferiblemente, el anticuerpo anti-VEGF es capaz de unirse al mismo epítipo VEGF que el anticuerpo A4.6.1. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab o ranibizumab.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 ilustra especificidades de unión de anticuerpos anti-NRP1. **(1A)** Anticuerpos anti-NRP1 se unen específicamente a NRP1 humana y murina. Las especificidades de unión de los anticuerpos anti-NRP1 YW64.3 y YW107.4 IgGs (10ug/ml) se evaluaron examinando la unión a pocillos recubiertos con hNRP1, mNRP1, hNRP2, mNRP2, ErbB2-ECD, o BSA, e IgGs unidas se detectaron mediante conjugados HRP IgG anti-humana. **(1B)** Análisis FACS de los anticuerpos anti-NRP1 YW64.3 y YW107.4 IgGs que muestran capacidad de unión de anticuerpo a la proteína NRP1 de superficie celular (HUVECs).

Figura 2 ilustra propiedades de unión del anticuerpo anti-NRP1 YW107.4 y su variante madurada por afinidad YW107.4.87 (anti- NRP1^B). **(2A)** Análisis cinético BIAcore de la variante YW107.4.87 madurada por afinidad. **(2B)** Análisis FACS de YW107.4 y YW107.4.87 IgGs que muestran una unión mejorada a la

15
24
18

superficie NRP1 de superficie celular (HUVECs) por la variante YW107.4.87 madurada por afinidad.

Figura 3 muestra las secuencias de región variable de YW 64.3 (anti-NRP1^A) y YW107.4.87 (anti-NRP1^B), con las secuencias de h4D5 listadas como referencia. La numeración se basa en la base de datos de Kabat. Las secuencias CDR están en la región encerrada en un casilla. **(3A)** Secuencias de región variable de cadena ligera para h4D5 (SEQ ID NO: 1), YW 64.3 (SEQ ID NO:3) y YW107.4.87 (SEQ ID NO:5). **(3B)** Secuencias de región variable de cadena pesada para h4D5 (SEQ ID NO:2), YW 64.3 (SEQ ID NO:4) y YW107.4.87 (SEQ ID NO:6).

Figura 4 describe el bloqueo de la unión de VEGF₁₆₅ a NRP1 por anticuerpos anti-NRP1.

Figura 5 describe la cuantificación de los análisis del colapso DRG inducido por Sema3A **(5A)** y el colapso del hipocampo inducido por Sema3F **(5B)**. Se muestra que anti-NRP1^A bloquea específicamente el colapso del cono de crecimiento inducido por Sema3A de neuronas DRG, pero no el colapso del cono del crecimiento inducido por Sema3F de las neuronas del hipocampo.

Figura 6 ilustra que los anticuerpos anti-NRP1 son capaces de inhibir la migración y el brote de HUVEC inducidos por VEGF *in vitro*. **(6A)** Cuantificación del análisis de migración, (n = 6 para cada condición). *p = 0.00003; **p=9.9x10⁻¹¹; Prueba t de Student. **(6B)** Cuantificación del análisis de brotes en microesferas, n = 12-14 microesferas por condición.

Figura 7 ilustra los efectos inhibitorios *in vivo* del anticuerpo anti-NRP1 sobre la remodelación vascular en el desarrollo de la retina del ratón. **(7A)** Ilustración del desarrollo vascular desde el día 5 pos-natal (P5) a P8. Los vasos se extienden en un patrón concéntrico hacia el borde de la retina. La cabeza del nervio óptico (ONH) se localiza en el centro de la retina; **(7B)** La remodelación vascular en proximidad del ONH tiene lugar entre P5 y P8; **(7C)** Ilustración de la formación de brotes vasculares en capas más profundas de la retina. Los vasos proyectan brotes hacia la capa plexiforme exterior (OPL) y forman un plexus. Brotes posteriores surgen entre las capas NFL y OPL, dando origen eventualmente a la capa plexiforme interior (IPL); **(7D)** Cuantificación de la

16
25
19

densidad vascular; conteo de píxeles totales de 12 imágenes representativas de 4 retinas tratadas de cada condición. * $p = 0.006$; ** $p < 0.0001$; prueba t de Student; (7E) Cuantificación de la extensión vascular, medida por la relación de la distancia de la ONH al borde de la vasculatura, sobre la distancia del ONH al borde de la copa retiniana. Se tomaron 12 medidas representativas de 4 retinas tratadas.

Figura 8 describe los efectos de anticuerpos anti-NRP1 sobre la permeabilidad vascular inducida por VEGF, proliferación de HUVEC, fosforilación de VEGFR2 y señalización descendente de VEGFR2. (8A) Cuantificación de análisis de permeabilidad vascular de la piel de ratón. Los valores mostrados fueron el promedio de 6 experimentos independientes ($p=0.69$ para anti-NRP1^A, y $p=0.989$ para anti-NRP1^B); (8B) Cuantificación de la proliferación de HUVEC en la presencia o ausencia de VEGF ($n=5$ para cada condición); (8C) Fosforilación VEGFR2 en HUVECs detectada por análisis ELISA usando anticuerpos que reconocieron VEGFR2 total o fosforilado por tirosina. El nivel de fosforilación VEGFR2 en células tratadas con anti-NRP1^A no fue significativamente diferente del grupo de control ($p=0.133$). * $p=0.00017$; prueba t de Student; (8D) Análisis de inmunotransferencia de lisados HUVEC. Las células se trataron con los anticuerpos indicados, seguidas por una incubación con VEGF.

Figura 9 ilustra los efectos de la inhibición del crecimiento del tumor por anticuerpos anti-NRP1 (solo o en combinación con anti-VEGF) en varios modelos de tumor xenoinjerto. (9A-C) Gráficas del volumen medio del tumor de los modelos de tumores SK-MES-1, H1299 y Fo5, respectivamente. (9D) Gráfico de Kaplan-Meier para el modelo de tumor SK-MES-1.

Figura 10 muestra los efectos vasculares por anticuerpos anti-NRP1 (solos o en combinación con anti-VEGF) en un modelo de tumor Fo5. (10A) Densidad vascular media (medida por perfusión de lectina); conteo de píxeles totales de 3-4 tumores tratados de cada condición. (10B) Densidad media de pericitos (medida por tinción/coloración PDGFR β). (10C) Relación vascular/pericitos que mide el cubrimiento relativo de pericitos.

Figura 11 ilustra el efecto aditivo de las inhibiciones NRP1 y VEGF sobre la remodelación vascular. 11A presenta un modelo en el cual bloquear la función NRP1 en vasos recién formados inhibe que los vasos experimenten remodelación

y la subsiguiente maduración, haciendo los vasos dependientes de VEGF para la supervivencia. **11B** muestra las variaciones en la densidad vascular media en la retina de ratones neonatos en la presencia de anti-NRP1B, anti-VEGF o la combinación de los mismos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones y a métodos novedosos para modular actividades biológicas mediadas por NRP.

Definiciones

"Neuropilina" o NRP se refiere colectivamente a neuropilina-1 (NRP1), neuropilina-2 (NRP2) y sus isoformas y variantes, como se describe en Rossignol et al. (2000) *Genomics* 70:211-222. Las neuropilinas son receptores no tirosina cinasa de 120 a 130 kDa. Existen múltiples variantes de empalme NRP-1 y NRP-2 e isoformas solubles. La estructura básica de las neuropilinas contiene cinco dominios: tres dominios extracelulares (a1a2, b1b2 y c), un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático. El dominio a1a2 es homólogo a los componentes de complemento C1r y C1s (CUB), que generalmente contiene cuatro residuos de cisteína que forman dos puentes disulfuro. El dominio b1b2 es homólogo a los factores V y VIII de coagulación. La porción central del dominio c se designa como MAM debido a su homología con la meprin, A5 y proteínas μ de fosfato de tirosina de receptor. Los dominios a1a2 y b1b2 son responsables de la unión a ligando, mientras que el dominio c es crítico para la homodimerización o heterodimerización. Gu et al. (2002) *J. Biol. Chem* 277:18069-76; He and Tessier-Lavigne (1997) *Cell* 90:739-51.

"Actividad biológica mediada por neuropilina" se refiere en general a episodios fisiológicos o patológicos en los cuales la neuropilina-1 y/o la neuropilina-2 juegan un papel sustancial. Ejemplos no limitantes de tales actividades son la orientación de axones durante el desarrollo del sistema nervioso

18
21
21

embrionario o la regeneración neuronal, angiogénesis (incluida la modelación vascular), la tumorigénesis y la metástasis de tumores.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y, específicamente, cubre anticuerpos monoclonales intactos (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud total), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

El término "anticuerpo monoclonal", como se emplea en esta solicitud, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de ocurrencia natural, que puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Más aún, en contraste con preparaciones convencionales de anticuerpo policlonal, que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El calificativo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no tiene que interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse por el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler et al. (1975) *Nature*, 256:495, o pueden elaborarse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al. (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en esta solicitud incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas), en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con, u homóloga a, secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular, o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntico con, u homólogo a, secuencias correspondientes en

19
28
22

anticuerpos derivados de otra especie, o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos 4,816,567; y Morrison *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855).

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor), en las cuales residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región base (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Más aún, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno y, típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente todos los bucles hipervariable corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá también por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para mayores detalles, véase Jones *et al.* (1986) *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature*, 332:323-329; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596.

Un "anticuerpo dependiente de la especie" es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte para un antígeno de una primera especie mamífera que la que tiene para un homólogo de ese antígeno de una segunda especie mamífera. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie "se une específicamente" a un antígeno humano (*es decir*, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de alrededor de 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de alrededor de 1×10^{-8} M y, muy preferiblemente, no más de alrededor de 1×10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión para un homólogo del antígeno de una segunda especie mamífera no

80
24
23

humana que es por lo menos de alrededor de 50 veces, o por lo menos de alrededor de 500 veces, o por lo menos de alrededor de 1000 veces, más débil que su afinidad de unión para el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los varios tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

Tal como se emplea aquí, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie en donde uno o más de los residuos de aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie se han modificado. Tales mutantes necesariamente tienen menos del 100% de identidad de secuencia o similitud con el anticuerpo dependiente de la especie. En una incorporación preferida, el mutante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos con por lo menos 75% identidad de secuencia de aminoácidos o similitud con la secuencia de aminoácidos de cualquiera del dominio variable de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo dependiente de la especie, más preferiblemente por lo menos 80%, más preferiblemente por lo menos 85%, más preferiblemente por lo menos 90% y, muy preferiblemente, por lo menos 95%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (*es decir*, el mismo residuo) o similares (*es decir*, residuo de aminoácidos del mismo grupo basado en propiedades comunes de cadena lateral, véase a continuación) con los residuos del anticuerpo dependiente de la especie, luego de alinear las secuencias e introducir vacíos, si es necesario, para obtener la máxima identidad de secuencia porcentual. Ninguna de las extensiones, eliminaciones o inserciones N-terminales, C-terminales, o internas en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable se interpretarán como afectando la identidad de o similitud de secuencia.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En incorporaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso del anticuerpo según se determine por el método de Lowry y, muy preferiblemente, más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de

24
20
24

secuencia de aminoácidos interna o N-terminal mediante el uso de un secuenciador de vaso, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul Coomassie o, preferiblemente, tintura de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes, puesto que por lo menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Por lo regular, sin embargo, el antagonista aislado se preparará por un paso de purificación, como mínimo.

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

Tal como se emplea aquí, el término "Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión a antígeno. Generalmente cada dominio variable tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de complementariedad puede contener residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" como se define por Kabat (por ejemplo, aproximadamente en los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, aproximadamente en los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). En algunos casos, una región determinante de complementariedad puede

incluir aminoácidos tanto de 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 base" (en lo sucesivo FR) son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos CDR. Generalmente cada dominio variable tiene cuatro FRs identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDRs se definen de acuerdo con Kabat, los residuos FR de cadena ligera se ubican aproximadamente en los residuos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3), y 98-107 (LCFR4) y los residuos FR de cadena pesada se ubican en alrededor de los residuos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3), y 103-113 (HCFR4) en los residuos de cadena pesada. Si las CDRs contienen residuos de aminoácidos de bucles hipervariables, los residuos FR de cadena ligera se ubican aproximadamente en los residuos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3), y 97-107 (LCFR4) en los residuos FR de cadena ligera y la cadena pesada se ubican aproximadamente en los residuos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3), y 102-113 (HCFR4) en los residuos de cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR contiene aminoácidos de ambos, una CDR como se define por Kabat aquellos de un bucle hipervariable, los residuos FR se ajustarán en consecuencia. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los residuos FR1 de cadena pesada se encuentran en las posiciones 1-25 y los residuos FR2 se encuentran en las posiciones 36-49.

Tal como se emplea aquí, "conjunto de codones" se refiere a un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos usadas para codificar aminoácidos de variante deseada. Un conjunto de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis de fase sólida, incluidas secuencias que representan todas las combinaciones posibles de tripletes de nucleótidos provistos por conjunto de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. Una forma estándar de designación de codones es la del código IUB, que se conoce en el arte y se describe aquí. Generalmente un conjunto de codones se representa por 3 letras mayúsculas en cursiva, por ejemplo *NNX*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* y similares. Un "conjunto de codones no aleatorio", tal como se emplea aquí, se refiere en consecuencia a un conjunto de codones que codifica aminoácidos seleccionados que satisfacen parcialmente, preferiblemente completamente, los criterios para la selección de aminoácidos como se describe en esta solicitud. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de

nucleótidos seleccionados en ciertas posiciones es bien conocida en el arte, por ejemplo el método TRIM (Knapppek et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 296:57-86); Garrard & Henner (1993) *Gene* 128: 103). Tales conjuntos de oligonucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores comerciales de ácidos nucleicos (disponibles, por ejemplo, de Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse en el comercio (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados con un conjunto particular de codones incluirá típicamente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, establecidas las diferencias por el conjunto de codones dentro de la secuencia total. Los oligonucleótidos, como se emplean de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación a un molde de ácidos nucleicos de dominio variable y además pueden, mas no necesariamente, incluir sitios de enzima de restricción útiles para, por ejemplo, propósitos de clonación.

Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y unión a antígeno. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en estrecha asociación, que puede ser covalente en naturaleza, por ejemplo en scFv. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . Colectivamente, las seis CDRs o un subconjunto de ellas confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. No obstante, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir antígeno, si bien con una afinidad más baja que todo el sitio de unión.

El fragmento "Fab" contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ comprenden un par de fragmentos Fab que por lo general se enlazan covalentemente cerca de sus términos carboxi por cisteínas de unión flexible entre ellos. En el arte se conocen asimismo otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios V_H V_L del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una

27
23
27

cadena única de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido Fv puede comprender además un enlazador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L , que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una reseña de scFv véase Plückthun 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 anticuerpo con dos sitios de unión de antígeno, los cuales fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica ($V_H - V_L$). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión de antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et. al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448.

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

Tal como se emplea aquí, "biblioteca" se refiere a una pluralidad de secuencias de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, polipéptidos de la invención), o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, siendo diferentes las secuencias en la combinación de aminoácidos de variante que se introducen en estas secuencias de acuerdo con los métodos de la invención.

"Exposición en bacteriófagos" es una técnica mediante la cual polipéptidos de variante se exponen como proteínas de fusión a por lo menos una porción del cápside en la superficie de partículas del bacteriófago, por ejemplo, un bacteriófago filamentoso. Una ventaja de la exposición en bacteriófagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorizadas pueden clasificarse rápida y eficientemente para aquellas secuencias que se unen a un antígeno diana con alta afinidad. La exposición de bibliotecas de péptidos y

proteínas en bacteriófagos se ha utilizado para detectar selectivamente millones de polipéptidos con propiedades específicas de unión. Métodos de exposición en bacteriófagos polivalentes se han usado para desplegar péptidos aleatorios pequeños y proteínas pequeñas mediante fusiones al gen III o al gen VIII de un bacteriófago filamentoso. Wells and Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:355-362, y las referencias citadas allí. En una exposición de bacteriófagos monovalentes, una biblioteca de proteínas o péptidos se fusiona a un gen III o una porción del mismo, y se expresa en bajos niveles en la presencia de la proteína del gen III de tipo natural, de modo que partículas del bacteriófago despliegan una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de avidéz se reducen en relación con el bacteriófago polivalente, de modo que la clasificación se hace sobre la base de afinidad intrínseca a ligando, y se emplean vectores de fagémido, que simplifican las manipulaciones de ADN. Lowman and Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3:205-0216.

Un "fagémido" es un vector plasmídico con un origen bacteriano de replicación, por ejemplo, Co1E1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido puede utilizarse en cualquier bacteriófago conocido, incluidos un bacteriófago filamentoso y un bacteriófago lambdoide. Generalmente, el plásmido contendrá además un marcador seleccionable para resistencia antibiótica. Segmentos de ADN clonados en estos vectores pueden propagarse como plásmidos. Cuando las células que alojan estos vectores se proveen con todos los genes necesarios para la producción de partículas de bacteriófago, el modo de replicación del plásmido cambia a una replicación por círculo rodante para generar copias de una hebra del ADN del plásmido y partículas de bacteriófago empaquetadas. El fagémido puede formar partículas de bacteriófago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de cápside de bacteriófago o fragmento del mismo enlazado a un gen de un polipéptido heterólogo como gen de fusión, de modo que el polipéptido heterólogo se despliega en la superficie de la partícula de bacteriófago.

El término "vector de bacteriófago" significa una forma replicativa bicatenaria de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y capaz de replicación. El vector de bacteriófago tiene un origen de replicación que permite la replicación del bacteriófago y la formación de partículas de bacteriófago. El bacteriófago es preferiblemente un bacteriófago filamentoso, tal como un

bacteriófago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado del mismo, o un bacteriófago lambdoide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado del mismo.

Tal como se emplea aquí, "posición accesible a disolvente" se refiere a una posición de un residuo de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo fuente o fragmento de unión a antígeno que se determina, basándose en la estructura, ensamble de estructuras y/o estructura modelada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como potencialmente disponible para acceso a disolvente y/o contacto con una molécula, tal como un antígeno específico de anticuerpo. Estas posiciones se encuentran generalmente en las CDRs y en el exterior de la proteína. Las posiciones accesibles a disolvente de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como se define en esta solicitud, pueden determinarse usando un número de algoritmos conocidos en el arte. Preferiblemente, posiciones accesibles a disolvente se determinan usando coordenadas de un modelo tridimensional de un anticuerpo, preferiblemente empleando un programa de computador tal como el programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). Las posiciones accesibles a disolvente pueden determinarse asimismo usando algoritmos conocidos en el arte (por ejemplo, Lee and Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55, 379 and Connolly (1983) *J. Appl. Cryst.* 16, 548). La determinación de posiciones accesibles a disolvente puede llevarse a cabo usando software apropiado para modelamiento de proteínas e información estructural tridimensional obtenida de un anticuerpo. Software que puede utilizarse para estos propósitos incluye SYBYL Biopolymer Module software (Tripos Associates). General y preferiblemente, donde un algoritmo (programa) requiere un parámetro de tamaño de entrada por el usuario, el "tamaño" de una sonda que se emplea en el cálculo se fija en aproximadamente en un radio de 1.4 Ångstrom o menos. Adicionalmente, la determinación de regiones accesibles a disolvente y métodos de área que usan software para computadores personales se ha descrito por Pacios (1994) *Comput. Chem.* 18(4): 377-386.

Un "factor o agente angiogénico" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogénesis, el crecimiento de células endoteliales, la estabilidad de los vasos sanguíneos, y/o la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, sin limitación, por ejemplo, el VEGF y miembros de la familia VEGF, PlGF, la familia

27
30

PDGF, la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), ligandos TIE (angiopoyetinas), efrinas, Del-1, factores de crecimiento de fibroblastos: ácido (aFGF) y básico (bFGF), folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor de dispersión (SF), Interleucina-8 (IL-8), Leptina, Midkine, neuropilinas, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas, especialmente PDGF-BB o PDGFR-beta, Pleiotrofina (PTN), Progranulina, Proliferina, factor- α de crecimiento transformante (TGF- α), factor- β de crecimiento transformante (TGF- β), factor- α de necrosis tumoral (TNF- α), etc. Incluiría igualmente factores que aceleran la curación de heridas, tales como la somatotropina, factor-I de crecimiento insulinoide (IGF-T), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia, y TGF- α y TGF- β . Véase, por ejemplo, Klagsbrun and D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179; Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364; Tonini et al. (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (e.g., Table 1 listing known angiogenic factors); and, Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206.

Un "agente anti-angiogénesis" o "inhibidor de angiogénesis" se refiere a una sustancia de peso molecular pequeño, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis, o permeabilidad vascular indeseable, bien directa o bien indirectamente. Debe entenderse que el agente anti-angiogénesis incluye aquellos 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 frente a un agente angiogénico como se describe anteriormente, por ejemplo, anticuerpos frente a VEGF-A o frente al receptor VEGF-A (por ejemplo, el receptor KDR o el receptor Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tales como Gleevec™ (Imatinib Mesylate). Los agentes anti-angiogénesis incluyen asimismo inhibidores angiogénicos naturales, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun and D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (e.g., Table 3 listing anti-angiogenic therapy in malignant melanoma); Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364; Tonini et al. (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (e.g., Table 2 listing known

28
31

antiangiogenic factors); and, Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (e.g., Table 1 listing anti- angiogenic agents used in clinical trials).

El término "VEGF" o "VEGF-A", tal como se emplea aquí, se refiere al factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165-aminoácidos y a los factores de crecimiento celular endotelial vascular humanos relacionados de 121, 189, y 206 aminoácidos, como se describe por Leung et al. (1989) *Science* 246:1306, and Houck et al. (1991) *Mol. Endocrin.* 5:1806, junto con sus formas alélicas de ocurrencia natural y procesadas. El término "VEGF" se refiere en igual forma VEGFs de especie no humana tal como ratón, rata o primate. A veces el VEGF de una especie específica se indica por términos tales como hVEGF para VEGF humano, mVEGF para VEGF murino, etc. El término "VEGF" se emplea también para referirse a formas trucadas del polipéptido que contiene los aminoácidos 8 a 109 ó 1 a 109 del factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácido. La referencia a cualquiera de tales formas de VEGF puede identificarse en la presente solicitud, por ejemplo, por "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" o "VEGF₁₆₅." Las posiciones de aminoácidos para un VEGF natural "truncado" se numeran como se indica en la secuencia VEGF natural. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en el VEGF natural truncado es también la posición 17 (metionina) en el VEGF natural. El VEGF natural truncado tiene afinidad de unión para los receptores KDR y Flt-1 comparable al VEGF natural.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con afinidad y especificidad suficientes. Preferiblemente, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede usarse como un agente terapéutico en seleccionar como diana e interferir enfermedades o afecciones en donde se encuentra implicada la actividad VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF habitualmente no se unirá a otros homólogos VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF. Un anticuerpo anti-VEGF preferido es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo como el anticuerpo anti-VEGF monoclonal A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709. Más preferiblemente el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante, generado de acuerdo con Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599, incluido pero no limitado al anticuerpo conocido como bevacizumab (BV; Avastin™).

29
38
32

El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "Avastin[®]", es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante, generado de acuerdo con Presta et al. (1997) *cancer Res.* 57.4593-4599. Comprende las regiones base de IgG1 humana mutada y las regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1 que bloquea la unión de VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente 93% de la secuencia de aminoácidos de Bevacizumab, incluida la mayoría de las regiones base, se deriva de la IgG1 humana, y aproximadamente 7% de la secuencia se deriva del anticuerpo murino A4.6.1. El Bevacizumab tiene una masa molecular de alrededor de 149.000 daltons y es glucosilado.

Un "antagonista VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, invalidar, reducir o interferir las actividades VEGF, incluidas su unión a uno o más receptores VEGF. Los antagonistas VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF y sus fragmentos de unión a antígeno, moléculas de receptor y derivados que se unen específicamente a VEGF secuestrando en esa forma su unión a uno o más, anticuerpos de receptor anti-VEGF y antagonistas de receptor VEGF tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina cinasas VEGFR.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Las personas necesitadas de tratamiento incluyen aquellas que ya sufren del trastorno, así como aquellas en las cuales tiene que prevenirse el trastorno.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Por ejemplo, mamíferos que sufren o necesitan profilaxis contra angiogénesis anormal (angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada) o permeabilidad vascular. Incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades, incluidas aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos que pueden tratarse en esta solicitud incluyen tumores benignos y malignos; leucemia y neoplasias malignas linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y

otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

La angiogénesis anormal ocurre cuando nuevos vasos sanguíneos crecen en forma excesiva, insuficiente o inapropiada (por ejemplo, siendo indeseables la ubicación, momento o iniciación de la angiogénesis desde un punto de vista médico) en un estado patológico o tal que ocasione un estado patológico. La angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada ocurre cuando hay un crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que contribuye a empeorar el estado patológico o causa el estado patológico, tal como en cáncer, especialmente tumores sólidos vascularizados y tumores metastásicos (incluido cáncer de colon, cáncer de pulmón (especialmente cáncer pulmonar microcítico), o cáncer de próstata), enfermedades causadas por neovascularización ocular, especialmente ceguera diabética, retinopatías, retinopatía primariamente diabética o degeneración macular relacionada con la edad (AMD), psoriasis, artritis psoriática, hemangioblastoma tal como hemangioma; enfermedades renales inflamatorias, tales como glomerulonefritis, especialmente glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome urémico hemolítico, nefropatía diabética o nefrosclerosis hipertensora; varias enfermedades inflamatorias, tales como artritis, especialmente artritis reumatoide, síndrome del intestino irritable, psoriasis, sarcoidosis, arteriosclerosis arterial y enfermedades que ocurren a raíz de transplantes, endometriosis o asma crónica y más de 70 otras afecciones. Los nuevos vasos sanguíneos pueden alimentar los tejidos enfermos, destruir los tejidos normales y, en el caso de cáncer, los nuevos vasos pueden permitir a las células neoplásicas escapar en la circulación y alojarse en otros órganos (metástasis del tumor). La angiogénesis insuficiente ocurre cuando hay un crecimiento inadecuado de vasos sanguíneos, que contribuye a empeorar un estado patológico, por ejemplo, en enfermedades tales como arteriopatía coronaria, apoplejía y cicatrización retardada de heridas. Además, úlceras, apoplejías e infartos del miocardio pueden resultar de la ausencia de angiogénesis que se requiere normalmente para la cicatrización natural. La presente invención contempla tratar estos pacientes que se encuentran en riesgo de desarrollar las afecciones ya mencionadas.

Otros pacientes que son candidatos para recibir los anticuerpos o polipéptidos de esta invención tienen, o están en riesgo de desarrollar,

proliferación anormal de tejido fibrovascular, acne rosacea, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, oclusión arterial, queratitis atópica, úlceras bacterianas, enfermedad de Beçhet, tumores transmitidos por la sangre, enfermedad obstructiva de las carótidas, neovascularización coroidea, inflamación crónica, desprendimiento retiniano crónico, uveítis crónica, vitritis crónica, desgaste excesivo por lentes de contacto, rechazo de injerto corneal, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, enfermedad de Crohn, enfermedad de Eales, queratoconjuntivitis epidémica, úlceras fúngicas, infecciones por Herpes simplex, infecciones por Herpes zoster, síndromes de hiperviscosidad, sarcoma de Kaposi, leucemia, degeneración de lípidos, enfermedad de Lyme, queratólisis marginal, úlcera de Mooren, infecciones por micobacterias distintas de lepra, miopía, enfermedad neovascular ocular, foveas de los nervios ópticos, síndrome de Osier-Weber (Osler-Weber-Rendu, osteoartritis, enfermedad de Paget, pars planitis, penfigoide, flictenulosis, poliartritis, complicaciones pos-láser, infecciones por protozoarios, pseudoxanthoma elasticum, queratitis seca del pterigio, queratotomía radial, neovascularización retiniana, retinopatía del prematuro, fibroplasias retrolenticulares, sarcoideo, escleritis, anemia drepanocítica, síndrome de Sjögren, tumores sólidos, enfermedad de Stargart, enfermedad de Steven Johnson, queratitis límbica superior, sífilis, lupus sistémico, degeneración marginal de Terrien, toxoplasmosis, trauma, tumores de sarcoma de Ewing, tumores de neuroblastoma, tumores de osteosarcoma, tumores de retinoblastoma, tumores de rabdomiosarcoma, colitis ulcerosa, oclusión de las venas, deficiencia de vitamina A y sarcoidosis de Wegener, angiogénesis indeseada asociada con diabetes, enfermedades parasitarias, cicatrización anormal de heridas, hipertrofia a raíz de cirugía, lesión o trauma, inhibición del crecimiento capilar, inhibición de la ovulación y formación del corpus luteum, inhibición de implantes e inhibición de desarrollo del embrión en el útero.

Las terapias anti-angiogénesis son útiles en el tratamiento general del rechazo de injerto, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, preeclampsia, efusión pericardial, tal como la asociada con pericarditis, y efusión pleural, enfermedades y trastornos caracterizados por permeabilidad vascular indeseable, por ejemplo, edema asociado con tumores cerebrales, ascitis asociada con neoplasias malignas, síndrome de Meigs, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, efusión pericardial, efusión pleural, permeabilidad asociada con

enfermedades cardiovasculares tales como la afección a raíz de infartos del miocardio y apoplejías y similares.

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

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a, o describen, la condición fisiológica en mamíferos, que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular incontrolado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales neoplasias malignas incluyen carcinoma epidermoide ("**squamous cell cancer**"), cáncer de pulmón (incluidos cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón amicrocítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma epidermoide del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o del estómago (incluido cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer del hígado, cáncer de la vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer del endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de la vulva, cáncer de la tiroides, carcinoma hepático, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de linfocitos B (incluido linfoma no hodgkiniano (NHL) folicular/grado bajo; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL folicular/grado intermedio; NHL difuso grado intermedio; NHL inmunoblástico grado alto; NHL linfoblástico grado alto; NHL de células pequeñas no hendidas grado alto; NHL de alta masa nodal; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo pos-transplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con

facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs.

El término "composición anti-neoplásica" se refiere a una composición útil en tratar cáncer, la cual contiene por lo menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, un "agente anti-neoplásico." Ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anti-neoplásicos) incluyen, sin limitación, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibitorios del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en terapia de radiación, agentes anti-angiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, y otros agentes para tratar cáncer, tales como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti-CD20, un antagonista de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina cinasa), un inhibidor HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (Imatinib Mesilato)), un inhibidor COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de las siguientes dianas receptor(es) ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. Las combinaciones de los mismos se incluyen también en la invención.

El término "agente citotóxico", tal como se usa en esta solicitud, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa destrucción de las células. El término tiene como finalidad incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluidas altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietlentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1);

eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimnustina; antibióticos tales como los antibióticos enediíno (*por ejemplo*, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1l y caliqueamicina omegal1 (véase, *por ejemplo*, Agnew (1994) *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluida dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos relacionados de cromoproteína enediíno), aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (incluidas morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidainine; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerine; pentostatina; phenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; 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 ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol- Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ formulación de nanopartículas diseñadas con albúmina, libres de cremophor, de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône- Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; GEMZAR® gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecano (Camptostar, CPT-11); (incluido el régimen de tratamiento de irinotecano con 5-FU y leucovorina); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combrestatina; leucovorina (LV); oxiplatino, incluido el régimen de tratamiento con oxiplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC- α , Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se encuentran incluidos en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos de receptor de estrógeno (SERMs – **selective estrogen receptor modulators**), incluidos, por ejemplo, tamoxifeno (incluido NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON toremifeno; inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, la cual regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestano, formestanie, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, y ARIMIDEX® anastrozol; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos complementarios, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicados en proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alpha, Ralf y H-Ras; ribozimas tales como el inhibidor de expresión VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de expresión HER2;

vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® inhibidor de topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina y Esperamicinas (véase Patente de los Estados Unidos No. 4,675,187) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El término "profármaco", tal como se emplea en esta solicitud, se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica a las células tumorales, comparada con el medicamento original, y que es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma original más activa. Véase, por ejemplo, Wilman (1986) "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast and Stella et al. (1985). "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press. Los profármacos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos con contenido de fosfato, profármacos con contenido de tiofosfato, profármacos con contenido de sulfato, profármacos con contenido de péptido, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos con contenido de β -lactama, profármacos con contenido de fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos con contenido de fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos de 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina, que pueden convertirse en el medicamento libre citotóxico más activo. Ejemplos de medicamentos citotóxicos, que pueden derivarse en una forma profármaco para uso en esta invención, incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos ya descritos.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual se asocia ordinariamente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o escenario en la cual se encuentra en la naturaleza. Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en células naturales. No obstante, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenidos en células que ordinariamente expresan el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora operacionalmente enlazada en un organismo hospedero particular. Las secuencias de control que son apropiadas para procariotas, por ejemplo, incluyen una secuencia promotora, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión de ribosoma. Las células eucarióticas son conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores ("**enhancers**").

Un ácido nucleico está "operacionalmente enlazado" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una pre-secuencia o líder secretor está operacionalmente enlazado al ADN para un polipéptido, si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador del fenotipo de los genes está operacionalmente enlazado a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosoma está operacionalmente enlazado a una secuencia codificadora si está situado de manera que facilite la traducción. Por lo general, "operacionalmente enlazado" significa que las secuencias de ADN que se están enlazando son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en la fase de lectura. No obstante, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlazamiento se efectúa mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o enlazantes se usan de acuerdo con la práctica convencional.

Tal como se emplea en esta solicitud, las expresiones "célula," "línea de células," y "cultivo de células" se usan indistintamente y todas las denominaciones incluyen progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de ella sin importar el número de transferencias. Se entiende además que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen progenies mutantes que tienen la misma función o actividad biológica como se identificaron sistemáticamente en la célula originalmente transformada. Donde se prevén designaciones distintas, será claro a partir del contexto.

Producción de Anticuerpos Anti-NRP1

La invención contemplada en esta solicitud proporciona anticuerpos anti-NRP1 novedosos. Métodos ejemplares de generar anticuerpos se describen con mayor detalle en las siguientes secciones.

Los novedosos anticuerpos anti-NRP1 se seleccionan utilizando el antígeno NRP1 derivado de una especie mamífera. Preferiblemente, el antígeno es NRP1 humano (hNRP1). No obstante, pueden usarse NRPs de otras especies tales como NRP1 murino (mNRP1) como el antígeno diana. Los antígenos NRP de varias especies mamíferas pueden aislarse de fuentes naturales. En otras incorporaciones, el antígeno es producido recombinantemente o se elabora usando otros métodos sintéticos conocidos en el arte.

Normalmente el anticuerpo seleccionado tendrá una afinidad de unión suficientemente fuerte para el antígeno NRP1. Por ejemplo, el anticuerpo puede unir hNRP1 con un valor K_d de no más de alrededor de 5 nM, preferiblemente no más de alrededor de 2 nM y, más preferiblemente, no más de alrededor de 500pM. Las afinidades de anticuerpos pueden determinarse mediante análisis de resonancia de plasmones superficiales (tal como el análisis BIAcore descrito en los Ejemplos); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y análisis de competición (RIA's), por ejemplo.

Además, el anticuerpo puede someterse a otros análisis de actividad biológica, por ejemplo, con el fin de evaluar su efectividad como terapéutico. Tales análisis son conocidos en el arte y dependen del antígeno diana y el uso previsto para el anticuerpo. Los ejemplos incluyen el análisis de inhibición HUVEC (como se describe en los Ejemplos siguientes); análisis de inhibición del crecimiento de células neoplásicas (como se describe en WO 89/06692, por ejemplo); análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (Patente de los Estados Unidos 5,500,362); y análisis de actividad agonística o hematopoyesis (véase WO 95/27062).

Para identificar sistemáticamente anticuerpos que se unen a un epítipo particular en un antígeno de interés, puede realizarse un análisis rutinario de

39
48
42

bloqueo cruzado tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, puede llevarse a cabo mapeo de epítomos, por ejemplo, como se describe en Champe et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 para determinar si el anticuerpo une un epítomo de interés.

Generación de Novedosos Anticuerpos Anti-NRP1 de Bibliotecas de de Bacteriófagos de Anticuerpos Sintéticos

En una incorporación preferida, la invención provee un método para generar y seleccionar novedosos anticuerpos anti-NRP1 usando un método único de exposición en bacteriófagos. El método implica la generación de bibliotecas de bacteriofágos de anticuerpos sintéticos basadas en un molde de estructura básica única ("**single framework template**"), diseño de suficientes diversidades en dominios variables, despliegue de polipéptidos con dominio variables diversificados, selección de anticuerpos candidatos con alta afinidad al antígeno NRP1 diana, y aislamiento de los anticuerpos seleccionados.

Detalles de los métodos de exposición en bacteriófagos pueden hallarse, por ejemplo, en WO03/102157 publicada el 11 de diciembre de 2003.

En un aspecto, las bibliotecas de anticuerpos utilizadas en la invención pueden generarse mutando las posiciones accesibles a disolvente y/o altamente diversas en por lo menos una CDR de un dominio variable de anticuerpo. Algunas o la totalidad de las CDRs pueden mutarse usando los métodos contemplados en esta solicitud. En algunas incorporaciones, puede ser preferible generar diversas bibliotecas de anticuerpos mutando posiciones en CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una biblioteca única o mutando posiciones en CDRL3 y CDRH3 para formar una biblioteca única o mutando posiciones en CDRL3 y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una biblioteca única.

Puede generarse una biblioteca de dominios variables de anticuerpos que tenga, por ejemplo, mutaciones en las posiciones accesibles a disolvente y/o altamente diversas de CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Puede generarse otra biblioteca que tenga mutaciones en CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Estas bibliotecas pueden utilizarse asimismo en conjunción una con otra para generar enlazantes

de afinidades deseadas. Por ejemplo, luego de una o más rondas de selección de bibliotecas de cadenas pesadas para unirse a un antígeno diana, puede reemplazarse una biblioteca de cadenas ligeras en la población de enlazantes de cadenas pesadas para rondas adicionales de selección con el fin de aumentar la afinidad de los enlazantes.

Preferiblemente, una biblioteca se crea por sustitución de aminoácidos originales con aminoácidos variantes en la región CDRH3 de la región variable de la secuencia de cadena pesada. La biblioteca resultante puede contener una pluralidad de secuencias de anticuerpo, en donde la diversidad de secuencia se da principalmente en la región CDRH3 de la secuencia de cadena pesada.

En un aspecto, la biblioteca se crea en el contexto de la secuencia del anticuerpo 4D5 humanizado, o la secuencia de los aminoácidos de la base de la secuencia del anticuerpo 4D5 humanizado. Preferiblemente, la biblioteca se crea por sustitución de por lo menos los residuos 95-100a de la cadena pesada con los aminoácidos codificados por el conjunto de codones *DVK*, en donde el conjunto de codones *DVK* se usa para codificar un conjunto de aminoácidos variantes para cada una de estas posiciones. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia $(PVK)_7$. En algunas incorporaciones, se crea una biblioteca por sustitución de los residuos 95-100a con aminoácidos codificados por ambos conjuntos de codones *DVK* y *NNK*. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia $(DVK)_6 (NNK)$. En otra incorporación, se crea una biblioteca por sustitución de por lo menos los residuos 95-100a con aminoácidos codificados por los dos conjuntos de codones *DVK* y *NNK*. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia $(DVK)_5 (NNK)$. Otro ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia $(NNK)_6$. Otros ejemplos de secuencias apropiadas de nucleótidos pueden determinarse por un experto en el arte de acuerdo con los criterios descritos aquí.

En otra incorporación, diferentes diseños CDRH3 se utilizan para aislar enlazantes de alta afinidad y para aislar enlazadores para una variedad de epítopos. El rango de longitudes de CDRH3 generados en esta biblioteca 11 a 13

aminoácidos, aunque pueden generarse igualmente longitudes diferentes de éstas. Puede ampliarse la diversidad H3 usando conjuntos de codones *NNK*, *DVK* y *NVK*, así como diversidad más limitada en N y/o C-terminal.

Puede generarse asimismo diversidad en CDRH1 y CDRH2. Los diseños de diversidades CDR-H1 y H2 siguen la estrategia del reconocimiento ("**targeting**") para imitar un repertorio de anticuerpos naturales, como se describe, con una modificación que enfoca la diversidad que más estrechamente coincide con la diversidad natural que el diseño anterior.

Para diversidad en CDRH3, pueden construirse múltiples bibliotecas en forma separada con diferentes longitudes de H3 y luego combinarse para seleccionar enlazantes a antígenos diana. Las múltiples bibliotecas pueden agruparse y seleccionarse usando métodos de clasificación de selección de soporte sólido y solución, como se describe previamente y más adelante en esta solicitud. Se pueden emplear múltiples estrategias de clasificación. Por ejemplo, una variación implica clasificar la diana unida a un sólido, seguida por clasificar una etiqueta que puede estar presente en el péptido de fusión (por ejemplo, una etiqueta anti-gD) y seguida por otra clasificación de la diana unida a un sólido. Alternativamente, las bibliotecas pueden clasificarse primero en la diana unida a una superficie sólida, los enlazantes eluido se clasifican luego usando unión de fase solución con concentraciones decrecientes del antígeno diana. La utilización de combinaciones de diferentes métodos de clasificación permite la minimización de la selección únicamente de secuencias altamente expresadas y posibilita la selección de un número de diferentes clones de alta afinidad.

Enlazantes de alta afinidad para el antígeno NRP1 diana pueden aislarse de las bibliotecas. Limitar la diversidad en la región H1/H2 disminuye la degradación alrededor de 10^4 a 10^5 veces y permitir más diversidad H3 permite enlazantes de afinidad más alta. Utilizar bibliotecas con diferentes tipos de diversidad en CDRH3 (por ejemplo, utilizar DVK o NVT) permite el aislamiento de enlazantes que pueden unirse a diferentes epítomos de un antígeno diana.

De los enlazantes aislados de las bibliotecas agrupadas, como se describe anteriormente, se ha descubierto que puede mejorarse aún más la afinidad proporcionando diversidad limitada en la cadena ligera. La diversidad de cadena

ligera se genera en esta incorporación en la siguiente forma en CDRL1: la posición de aminoácido 28 se codifica por RDT; la posición de aminoácido 20 se codifica por RKT; la posición de aminoácido 30 se codifica por RVW; la posición de aminoácido 31 se codifica por ANW; la posición de aminoácido 32 se codifica por THT; opcionalmente, la posición de aminoácido 33 se codifica por CTG; en CDRL2: la posición de aminoácido 50 se codifica por KBG; la posición de aminoácido 53 se codifica por AVC; y opcionalmente, la posición de aminoácido 55 se codifica por GMA; en CDRL3: la posición de aminoácido 91 se codifica por TMT o SRT o ambos; la posición de aminoácido 92 se codifica por DMC; la posición de aminoácido 93 se codifica por RVT; la posición de aminoácido 94 se codifica por NHT; y la posición de aminoácido 96 se codifica por TWT o YKG o ambos.

En otra incorporación, se generan una biblioteca o bibliotecas con diversidad en las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3. En esta incorporación, la diversidad en CDRH3 se genera usando una variedad de longitudes de regiones H3 y empleando principalmente los conjuntos de codones XYZ y NNK o NNS. Pueden formarse bibliotecas usando oligonucleótidos individuales y agruparse o pueden agruparse oligonucleótidos para formar un subconjunto de bibliotecas. Las bibliotecas de esta incorporación pueden clasificarse contra la diana unida a sólido. Clones aislados de múltiples clasificaciones pueden identificarse sistemáticamente en cuanto a especificidad y afinidad usando análisis ELISA. Para la especificidad, los clones pueden identificarse sistemáticamente contra los antígenos diana deseados, así como otros antígenos distintos al antígeno diana. Aquellos enlazantes al antígeno NRP1 diana pueden luego identificarse sistemáticamente con respecto a afinidad en un análisis ELISA de competición de unión a solución o análisis de competición *spot*. Enlazantes de alta afinidad pueden aislarse de la biblioteca utilizando los conjuntos de codones XYZ preparados como se describe anteriormente. Estos enlazantes pueden producirse fácilmente como anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno en alto rendimiento en cultivo de células.

En algunas incorporaciones, puede ser deseable generar bibliotecas con una diversidad mayor en longitudes de la región CDRH3. Por ejemplo, puede ser deseable generar bibliotecas con regiones CDRH3 que varíen desde alrededor de 7 a 19 aminoácidos.

47-
52
46

Enlazantes de alta afinidad aislados de las bibliotecas de estas incorporaciones se producen fácilmente en cultivos de bacterias y células eucariotas con alto rendimiento. Los vectores pueden diseñarse para eliminar fácilmente secuencias tales como marcas gD, secuencia de componentes de cápside vírico, y/o agregar secuencias de región constante para facilitar la producción de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno con alto rendimiento.

Una biblioteca con mutaciones en CDRH3 puede combinarse con una biblioteca que contiene versiones variantes de otras CDRs, por ejemplo CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 y/o CDRH2. En consecuencia, por ejemplo, en una incorporación, una biblioteca CDRH3 se combina con una biblioteca CDRL3 creada en el contexto de la secuencia de anticuerpo 4D5 humanizado con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 29, 30, 31, y/o 32 usando conjuntos de codones predeterminados. En otra incorporación, una biblioteca con mutaciones a la CDRH3 puede combinarse con una biblioteca que comprende dominios variables de cadena pesada CDRH1 y/o CDRH2 variantes. En una incorporación, la biblioteca CDRH1 se crea con la secuencia de anticuerpo 4D5 humanizado con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 30, 31, 32 y 33. Una biblioteca CDRH2 puede crearse con la secuencia de anticuerpo 4D5 humanizado con aminoácidos variantes en las posiciones 50, 52, 53, 54, 56 y 58 usando los conjuntos de codones predeterminados.

Mutantes de Anticuerpo Anti-NRP1

El novedoso anticuerpo anti-NRP1 generado de bibliotecas de bacteriófagos puede modificarse aún más para generar mutantes de anticuerpo con propiedades físicas, químicas o biológicas mejoradas sobre el anticuerpo progenitor. Donde el análisis empelado es un análisis de actividad biológica, el mutante de anticuerpo tiene preferiblemente una actividad biológica en el análisis de elección que es por lo menos de alrededor de 10 veces mejor, preferiblemente por lo menos de alrededor de 20 veces mejor, más preferiblemente por lo menos de alrededor de 50 veces mejor y, algunas veces, por lo menos de alrededor de 100 veces o 200 veces mejor, que la actividad biológica del anticuerpo progenitor en el análisis. Por ejemplo, una mutante de anticuerpo anti-NRP1 tiene

FF
42

preferiblemente una afinidad de unión para NRP1 que es por lo menos de alrededor de 10 veces más fuerte, preferiblemente por lo menos de alrededor de 20 veces más fuerte, más preferiblemente por lo menos de alrededor de 50 veces más fuerte y, algunas veces, por lo menos de alrededor de 100 veces o 200 veces más fuerte, que la afinidad de unión del anticuerpo anti-NRP1 progenitor.

Para generar el mutante de anticuerpo, se introducen una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo progenitor. Alternativamente, o adicionalmente, pueden introducirse una o más alteraciones (por ejemplo, sustituciones) de residuos de región base may en el anticuerpo progenitor donde éstas resultan en una mejora en la afinidad de unión del mutante de anticuerpo para el antígeno de la segunda especie mamífera. Ejemplos de residuos de región base a modificar incluyen aquellos que no unen covalentemente el antígeno en forma directa (Amit et al. (1986) *Science* 233:747-753); interactúan con/afectan la conformación de una CDR (Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917); y/o participan en la interfase $V_L - V_H$ (EP 239 400B1). En ciertas incorporaciones, la modificación de uno o más de tales residuos de región base resulta en una intensificación de la afinidad de unión del anticuerpo para el antígeno de la segunda especie mamífera. Por ejemplo, desde alrededor de uno a alrededor de cinco residuos de región pueden alterarse en esta incorporación de la invención. A veces, esto puede ser suficiente para producir un mutante de anticuerpo apropiado para uso en estudios clínicos, incluso donde ninguno de los residuos de región hipervariable ha sido alterado. Normalmente, sin embargo, el mutante de anticuerpo comprende alteraciones adicionales de región hipervariable.

Los residuos de región hipervariable que se alteran pueden cambiarse en forma aleatoria, especialmente donde la afinidad de unión inicial del anticuerpo progenitor es tal que dichos mutantes de anticuerpo producidos aleatoriamente pueden detectarse selectivamente con facilidad.

Un procedimiento útil para generar tales mutantes de anticuerpo se denomina "mutagénesis de rastreo de alanina" (Cunningham and Wells (1989) *Science* 244:1081-1085). Aquí, uno o más de los residuos de región hipervariable se reemplazan por residuos de alanina o polialanina para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno de la segunda especie mamífera. Aquellos

residuos de región hipervariable que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo mutaciones adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. En consecuencia, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Los mutantes *ala* producidos de esta manera se identifican sistemáticamente respecto a su actividad biológica como se describe en esta solicitud.

Normalmente se comenzaría con una sustitución conservadora tal como las indicadas a continuación bajo el título "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión), entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la siguiente tabla, o como se escribe con más detalle a continuación con referencia a clases de aminoácidos, y se criban los productos.

Sustituciones Preferidas:

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	Pro; ala	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Modificaciones aún más sustanciales en las propiedades biológicas de los anticuerpos se llevan a cabo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura primaria del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como conformación de hoja o helicoide, (b) la carga de hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el grosor de la cadena lateral. Residuos de ocurrencia natural se dividen en grupos basados en propiedades comunes de cadena lateral:

- (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 en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Sustituciones no conservadoras incluirán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

En otra incorporación, los sitios seleccionados para modificación se maduran por afinidad utilizando exposición en bacteriófagos (véase más arriba). Moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de secuencia de aminoácidos se preparan por una variedad de métodos conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis PCR, y mutagénesis de casete de un mutante preparado previamente o una versión no mutante del anticuerpo progenitor. El método preferido para elaborar mutantes es mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488).

En ciertas incorporaciones, el mutante de anticuerpo tendrá únicamente un solo residuo de región hipervariable sustituido. En otras incorporaciones, se habrán sustituido dos o más de los residuos de la región hipervariable del anticuerpo progenitor, por ejemplo, desde alrededor de dos a alrededor de diez sustituciones de región hipervariables.

Por lo general, el mutante de anticuerpo con propiedades biológicas mejoradas tendrá una secuencia de aminoácidos con por lo menos 75% de

75
\$6
50

identidad de secuencia de aminoácidos o similitud con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dos dominio de cadena pesada o ligera del anticuerpo progenitor, más preferiblemente por lo menos 80%, más preferiblemente por lo menos 85%, más preferiblemente por lo menos 90% y, muy preferiblemente, por lo menos 95%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en esta solicitud como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similares (es decir, residuo de aminoácidos del mismo grupo basado en propiedades comunes de cadena lateral, véase más arriba) con los residuos del anticuerpo progenitor, luego de alinear las secuencias e introducir vacíos, si es necesario, para obtener la identidad de secuencia porcentual máxima. Ninguna de las extensiones, eliminaciones, o inserciones N-terminales, C-terminales, o internas en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable se interpretarán como afectando la identidad o similitud de secuencia.

Luego de la producción del mutante de anticuerpo, se determina la actividad biológica de esa molécula relativa al anticuerpo progenitor. Como se anotó anteriormente, esto puede implicar determinar la afinidad de unión y/o otras actividades biológicas del anticuerpo. En una incorporación preferida de la invención, se prepara un panel de mutantes de anticuerpo y se criba con respecto a afinidad de unión para el antígeno tal como NRP1 o un fragmento del mismo. Uno o más de los mutantes de anticuerpo seleccionados de este cribado inicial se someten opcionalmente a uno o más análisis adicionales de actividad biológica para confirmar que el mutante(s) de anticuerpo con afinidad de unión mejorada son efectivamente útiles, por ejemplo, para estudios clínicos.

El mutante(s) de anticuerpo así seleccionado(s) puede someterse a modificaciones adicionales, dependientes a menudo del uso previsto del anticuerpo. Tales modificaciones pueden involucrar la alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, fusión a polipéptido(s) heterólogo(s) y/o modificaciones covalentes tales como las explicadas a continuación. Con respecto a las alteraciones de secuencia de aminoácidos, modificaciones ejemplares se explican más arriba. Por ejemplo, puede sustituirse igualmente cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación adecuada del mutante de anticuerpo, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el enlazamiento cruzado aberrante. Inversamente, pueden

agregarse enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv). Otro tipo de mutante de aminoácidos tiene un patrón de glucosilación alterado. Esto puede lograrse eliminando una o más fracciones carbohidrato halladas en el anticuerpo, y/o agregando uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos es típicamente N- o O-enlazada. N-enlazada se refiere a la unión de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por consiguiente, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. Glucosilación O-enlazada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, muy comúnmente serina o treonina, si bien pueden usarse igualmente 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se lleva convenientemente a cabo alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos ya descritas (para sitios de glucosilación N-enlazados). La alteración puede hacerse además por la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación O-enlazados).

Vectores, Células Hospederas y Métodos Recombinantes

El anticuerpo anti-NRP1 de la invención puede producirse recombinantemente, usando técnicas y materiales fácilmente obtenibles.

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-NRP1, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación posterior (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla o sintetiza fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a ADNs que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo). Hay muchos vectores disponibles. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una

49
58
52

secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

El anticuerpo de esta invención puede producirse en forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de segmentación específico en el N-término de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferiblemente una que es reconocida y procesada (es decir, segmentada por una peptidasa señal) por la célula hospedera. Para células hospedera procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal de anticuerpo natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de líderes fosfatasa alcalina, penicilinas, 1pp, o de enterotoxina II estable al calor. Para la segregación de levadura la secuencia señal natural puede sustituirse, por ejemplo, por el líder levadura invertasa, líder de factor α (incluidos líderes de factor α *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder fosfatasa ácida, el líder glucoamilasa *C. albicans*, o la señal descrita en WO 90/13646. En la expresión de células mamíferas, se dispone de secuencias señal mamíferas, así como líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal herpes simplex gD.

El ADN para tal región precursora se liga en el marco de lectura a ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen del componente de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos, que permite que el vector se replique en una o más células hospederas seleccionadas. Generalmente, en la clonación de vectores esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico hospedero, e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican autónomamente. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es apropiado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es apropiado para levadura, y varios

orígenes víricos (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el componente del origen de replicación no se necesita para vectores de expresión de mamífero (el origen SV40 puede usarse típicamente sólo porque contiene el promotor temprano).

(iii) Componente del gen de selección

Vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, conocido también como un marcador seleccionable. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un medicamento para detener el crecimiento de una célula hospedera. Aquellas células que se transforman exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a medicamento y, por consiguiente, sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de tal selección dominante utilizan los medicamentos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables apropiados para células mamíferas son aquellos que permiten la identificación de células competentes para incorporar el ácido nucleico del anticuerpo, tales como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferiblemente genes metalotioneína de primate, adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

Por ejemplo, células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primeramente cultivando la totalidad de los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedera apropiada, cuando se emplea DHFR natural, es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), deficiente en actividad DHFR.

Alternativamente, células hospederas (particularmente hospederas naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo, proteína DHFR natural, y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH)

pueden seleccionarse por crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina, o G418. Véase Patente de los Estados Unidos No. 4,965,199.

Un gen de selección apropiado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al. (1979) *Nature*, 282:39). El gen *trp1* provee un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones (1977) *Genetics*, 85:12. La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedera de levadura provee entonces un ambiente efectivo para detectar transformación por crecimiento en la ausencia de triptófano. Análogamente, cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20,622 ó 38,626) se complementan por plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*.

Adicionalmente, vectores derivados del plásmido circular pKD1 de 1.6 μ m pueden usarse para transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante se divulgó para *K. lactis*. Van den Berg (1990) *Bio/Technology* 8:135. También se han divulgado vectores de expresión estables, multi-copia, para secreción de albúmina sérica humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer et al. (1991) *Bio/Technology* 9:968-975.

(iv) Componente del promotor

Usualmente los vectores de expresión y clonación contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedero y se enlaza operacionalmente al ácido nucleico del anticuerpo. Promotores apropiados para uso con hospederos procarióticos incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, alcalina fosfatasa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. No obstante, son apropiados otros promotores bacterianos conocidos. Promotores para uso en sistemas bacterianos contendrán asimismo una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) enlazada operacionalmente al ADN, que codifica el anticuerpo.

Secuencias de promotor son conocidas para eucariotas. Virtualmente todos los genes eucarióticos que tienen una región rica en AT, localizada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases corriente arriba desde el inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos está una secuencia AATAAA, que puede ser la señal para adición de la cola poly A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan apropiadamente en vectores de expresión eucariotas.

Ejemplos de secuencias promotoras apropiadas para uso con hospederos de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, hexocinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol dehidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, y enzimas responsables para la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores apropiados para uso en expresión de levadura se describen también en EP 73,657. Asimismo, potenciadores de levadura se usan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos de vectores en células hospederas de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como polioma virus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y, muy preferiblemente, virus de simio 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células hospederas.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente de un fragmento de restricción de SV40 que contiene asimismo el origen de replicación vírica SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN, en hospederos mamíferos usando el virus de papiloma bovino como vector, se divulga en la Patente de los Estados Unidos No. 4,419,446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,601,978. Véase también Reyes et al. (1982) *Nature* 297:598-601 respecto a la expresión de ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus herpes simplex. Alternativamente, la repetición de terminal larga del virus de sarcoma de Rous puede usarse como el promotor.

(v) Componente del elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo de receptor anti-Apo-2L de esta invención por eucariotas superiores se incrementa a menudo insertando una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv (1982) *Nature* 297:17-18 con respecto a elementos potenciadores para activación de promotores eucariotas. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' ó 3' a la secuencia codificante del anticuerpo, pero se localiza preferiblemente en el sitio 5' del promotor.

(vi) Componente de terminación de transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospederas eucariotas (células de levadura, hongos, insecto, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán igualmente secuencias necesarias para la terminación de transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias se encuentran comúnmente disponibles de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas, de ADNs víricos o eucariotas o ADNc. Estas

54
63
52

regiones contienen segmentos de nucleótido transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente útil de terminación de transcripción es la región de poliadenilación de somatropina bovina. Véase WO94/11026 y el vector de expresión divulgado allí.

(vii) Selección y transformación de células hospederas

Células hospederas apropiadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en esta solicitud son las células procariotas, levadura, o eucariotas superiores descritas anteriormente. Procariotas apropiados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como Escherichia, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en DD 266,710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedero de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque son apropiadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

Aparte de los procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospederos de clonación o expresión apropiados para vectores que codifican el anticuerpo. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común de panadería, es el más comúnmente usado entre los microorganismos hospederos eucariotas inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas se encuentran comúnmente disponibles y son útiles en esta solicitud, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospederos *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospederos *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Células hospederas apropiadas para la expresión de anticuerpo glucosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y células hospederas de insecto permitidas correspondientes de hospederos tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas víricas para transfección se encuentran a disposición del público, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden utilizarse en esta solicitud, de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Como hospederos pueden utilizarse igualmente cultivos de células vegetales de algodón, maíz, papa, frijol de soya, petunia, tomate y tabaco.

No obstante, ha sido enorme el interés en células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha vuelto un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células de hospederos mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 ó 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al. (1997) *J. Gen Virol.* 36:59); células de riñón de crías de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216); células Sertoli de ratón (TM4, Mather (1980) *Biol. Reprod.* 23:243-251); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono African green (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51), células TRI (Mather et al. (1982) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68), células MRC 5; células FS4; una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Células hospederas se transforman con los vectores de expresión y clonación ya descritos para producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional, modificado según sea apropiado para inducir promotores,

seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de las células hospederas

Las células hospederas usadas para producir el anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios disponibles en el comercio tales como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son apropiados para cultivar las células hospederas. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos en Ham et al. (1990), *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al. (1980), *Anal. Biochem.* 102:255, Patentes de los Estados Unidos No. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de los Estados Unidos Re. 30,985 puede utilizarse como medio de cultivo para las células hospederas. Cualquiera de estos medios pueden suplementarse, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), soluciones amortiguadoras (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el medicamento GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualesquiera otros suplementos necesarios pueden incluirse asimismo en concentraciones apropiadas que serían conocidas a los expertos en el arte. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las empleadas previamente con la célula hospedera seleccionada para expresión, y serán evidentes para el artesano de experiencia ordinaria.

(ix) Purificación de anticuerpo

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o segregarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como un primer paso, los desechos de particulado, ya sea células hospederas o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al. (1992) *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se segregan al espacio periplásmico de *E. coli*. En pocas palabras, pasta celular se descongela en la presencia de acetato de sodio (pH

57
66
60

3.5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante alrededor de 30 minutos. Los desechos celulares pueden eliminarse por centrifugación. Donde el anticuerpo se segrega en el medio, generalmente los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran primero usando un filtro de concentración de proteína disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir proteólisis, y pueden incorporarse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo, preparada de las células, puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, ó $\gamma 4$ (Lindmark et al. (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al. (1986) *EMBO J.* 5:1567-1575). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero se encuentran disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables, tales como cristal de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Donde el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. Dependiendo del anticuerpo a recuperarse, se encuentran disponibles también otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía en SEPHAROSE™ o una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofocado ("**chromatofocusing**"), SDS-PAGE, y precipitación en sulfato de amonio.

Siguiendo cualquier paso(s) de purificación preliminar, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un amortiguador de

58
67
61

elución con un pH entre alrededor de 2.5-4.5, realizada preferiblemente con bajas concentraciones de sal (por ejemplo, desde alrededor de 0-0.25M de sal).

Formulaciones Farmacéuticas

Formulaciones terapéuticas del anticuerpo se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo, que tiene el grado deseado de pureza, con sustancias portadoras, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Sustancias portadoras, diluyentes, excipientes y estabilizantes aceptables son preferiblemente atóxicos a los destinatarios en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluidos ácido ascórbico y metionina; preservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 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 incluidos glucosa, mannososa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; iones contrarios formadores de sales tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilen glicol (PEG).

La formulación puede contener asimismo más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente unas con otras. Por ejemplo, puede ser deseable proveer además un agente inmunosupresor. Tales moléculas están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito previsto.

En igual forma los ingredientes activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de aglomeración o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales

de liberación de medicamentos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a utilizarse para administración *in vivo* tienen que ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtrado estéril.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como etilen vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo por un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y cambios posibles en la inmunogenicidad. Pueden concebirse estrategias razonables para la estabilización, dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermolecular mediante intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específica.

60
69
63

Usos Terapéuticos

Se contempla que el anticuerpo de la presente invención pueda usarse para tratar un mamífero. En una incorporación, el anticuerpo se administra a un mamífero no humano para los propósitos de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Mamíferos ejemplares no humanos a tratarse incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y demás mamíferos en los cuales se realizan estudios preclínicos. Tales mamíferos pueden establecerse en modelos animales para una enfermedad a tratar con el anticuerpo o pueden usarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas incorporaciones, estudios de dosis escalonada pueden llevarse a cabo en el mamífero. Donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-NRP1, éste puede administrarse a un roedor hospedero en un modelo de tumor sólido, por ejemplo.

Adicionalmente, o en forma alternativa, el anticuerpo se usa para tratar un humano, por ejemplo, un paciente que sufre de una enfermedad o trastorno, el cual se podría beneficiar de la administración del anticuerpo.

La presente invención abarca la terapia angiogénica de cáncer, una novedosa estrategia para el tratamiento del cáncer, dirigida a inhibir el desarrollo de los vasos sanguíneos del tumor, requeridos para aportar nutrientes que favorezcan el crecimiento del tumor. Debido a que la angiogénesis se encuentra implicada tanto en el crecimiento primario del tumor como en la metástasis, el tratamiento angiogénico provisto por la invención está en capacidad de inhibir el crecimiento neoplásico del tumor en el sitio primario, así como de prevenir la metástasis de tumores en los sitios secundarios, permitiendo así el ataque de los tumores por otros terapéuticos. Ejemplos de cáncer a tratarse incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales neoplasias malignas incluyen carcinoma epidermoide ("*squamous cell cancer*"), cáncer de pulmón (incluidos cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón amicrocítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma epidermoide del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o del estómago (incluido cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer del hígado, cáncer de la vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer del endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de la

61
70
64

vulva, cáncer de la tiroides, carcinoma hepático, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de linfocitos B (incluido linfoma no hodgkiniano (NHL) folicular/grado bajo; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL folicular/grado intermedio; NHL difuso grado intermedio; NHL inmunoblástico grado alto; NHL linfoblástico grado alto; NHL de células pequeñas no hendidas grado alto; NHL de alta masa nodal; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo pos-transplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs. Más particularmente, neoplasias malignas que son asequibles a tratamiento por los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer pulmonar amicrocítico, linfoma no hodgkiniano (NHL), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovarios, mesotelioma, y mieloma múltiple. Más preferiblemente, los métodos de la invención se usan para tratar cáncer colorrectal en un paciente humano.

Se contempla que cuando se usan para tratar varias enfermedades tales como tumores, los anticuerpos de la invención puedan combinarse con otros agentes terapéuticos apropiados para las mismas o similares enfermedades. Cuando se emplean para tratar cáncer, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en combinación con terapias anti-cáncer convencionales, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia o sus combinaciones.

En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia anti-cáncer de combinación con el anticuerpo de la invención incluyen otros agentes anti-angiogénicos. Muchos agentes anti-angiogénicos se han identificado y se conocen en el arte, incluidos los enumerados por Carmeliet and Jain (2000).

En un aspecto, el anticuerpo de la invención se usa en combinación con un antagonista VEGF o un antagonista de receptor VEGF tales como anticuerpos anti-VEGF, variantes VEGF, fragmentos de receptor VEGF soluble, aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR neutralizantes, inhibidores de tirosina cinasas VEGFR y cualesquiera de sus combinaciones.

Alternativamente, o además, dos o más anticuerpos anti-NRP1 pueden co-administrarse al paciente. En una incorporación más preferida, el anticuerpo anti-NRP1^A o anti-NRP^B de la invención se usa en combinación con un anticuerpo anti-VEGF para generar efectos aditivos o sinérgicos. Anticuerpos anti-VEGF preferidos incluyen los que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1. Más preferiblemente el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab o ranibizumab.

En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia anti-neoplásica de combinación con el anticuerpo de la invención incluyen antagonista de otros factores que están involucrados en el crecimiento del tumor, tales como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2) ErbB3, ErbB4, o TNF. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NRP1 de la invención puede usarse en combinación con inhibidores tirosina cinasa de receptor de molécula pequeña (RTKIs) que reconocen uno o más receptores de tirosina cinasa tales como los receptores VEGF, los receptores FGF, los receptores EGF y los receptores PDGF. En el arte se conocen muchos RTKIs terapéuticos de molécula pequeña, incluidos, sin limitación, vatalanib (PTK787), erlotinib (TARCEVA[®]), OSI-7904, ZD6474 (ZACTMA[®]), ZD6126 (ANG453), ZD1839, sunitinib (SUTENT[®]), semaxanib (SU5416), AMG706, AG013736, Imatinib (GLEEVEC[®]), MLN-518, CEP-701, PKC-412, Lapatinib (GSK572016), VELCADE[®], AZD2171, sorafenib (NEXAVAR[®]), XL880, y CHIR-265.

El anticuerpo anti-NRP1 de la invención, solo o en combinación con un segundo agente terapéutico (tal como un anticuerpo anti-VEGF) puede usarse además en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. Una variedad de agentes quimioterapéuticos pueden emplearse en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Un listado ejemplar y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados se provee en esta solicitud bajo "Definiciones".

Cuando el anticuerpo anti-NRP1 se co-administra con un segundo agente terapéutico, el segundo agente terapéutico puede administrarse en primer lugar, seguido por el anticuerpo anti-NRP1. No obstante, también se contempla la administración simultánea o la administración del anticuerpo anti-NRP1 primero. Posologías apropiadas para el segundo agente terapéutico son las empleadas en

67
22
66

la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y anticuerpo anti-NRP1.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la posología apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratarse, la gravedad y ciclo de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante del paciente. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, alrededor de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0.1-20 mg/kg) de anticuerpo es una posología candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una posología diaria típica podría variar desde alrededor de 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores ya mencionados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se sostiene hasta cuando ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. No obstante, otros regímenes posológicos pueden ser útiles. En un aspecto preferido, el anticuerpo de la invención se administra cada dos o tres semanas, con una dosis en el rango de alrededor de 5mg/kg a alrededor de 15 mg/kg. Más preferiblemente, tal régimen posológico se usa en combinación con un régimen de quimioterapia como terapia de primera línea para tratar cáncer colorrectal metastásico. En algunos aspectos, el régimen de quimioterapia implica la administración intermitente de alta dosis tradicional. En algunos otros aspectos, los agentes quimioterapéuticos se administran usando dosis más frecuentes y más pequeñas sin interrupciones programadas ("quimioterapia metronómica"). El avance de esta terapia se monitorea fácilmente por técnicas y análisis convencionales.

La composición de anticuerpo se formulará, dosificará, y administrará en una forma consistente con la buena práctica médica. Factores para considerar en este contexto incluyen la enfermedad o trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular sometido a tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa de la enfermedad o trastorno, el sitio de liberación del agente, el método de administración, el horario pautado de administración, y otros factores

67
12
07

conocidos por los profesionales en medicina. La "cantidad terapéuticamente efectiva" del anticuerpo a administrarse se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar una enfermedad o desorden. El anticuerpo no necesita, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes corrientemente utilizados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores ya discutidos. Estos agentes se usan generalmente en las mismas posologías y con vías de administración como las empleadas más arriba en el texto o alrededor de 1 a 99% de las posologías utilizadas hasta la fecha. Generalmente, el alivio o tratamiento de una enfermedad o trastorno implica la disminución de uno o más síntomas o problemas médicos asociados con la enfermedad o trastorno. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del medicamento puede cumplir a cabalidad uno de los siguientes, o una combinación de los mismos: reducir el número de células cancerosas; disminuir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, reducir en cierta medida y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir la metástasis del tumor; inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el medicamento pueda prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En algunas incorporaciones, una composición de esta invención puede usarse para prevenir la aparición o re-ocurrencia de la enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero.

Usos No Terapéuticos

Los anticuerpos de la invención pueden usarse como un agente de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida tal como una resina Sephadex™ o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en el arte. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno a purificarse y, posteriormente, el soporte se lava con un disolvente apropiado que retirará sustancialmente todo el material en la muestra, excepto el antígeno a purificarse, el cual está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente apropiado, tal como amortiguador de glicina, pH 5.0, que liberará el antígeno del anticuerpo.

65
7/25
08

Los anticuerpos pueden ser también útiles en análisis diagnósticos, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células específicas, tejidos, o suero.

Para aplicaciones diagnósticas, el anticuerpo se marcará típicamente con una fracción detectable. Se dispone de numerosas etiquetas que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen et al. (1991), Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs., por ejemplo, y la radioactividad puede medirse utilizando conteo de escintilación.

(b) Etiquetas fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansyl, Lissamine, ficoeritrina y Rojo Texas se encuentran disponibles. Las etiquetas fluorescentes pueden conjugarse al anticuerpo usando las técnicas divulgadas en *Current Protocols in Immunology*, más arriba, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse empleando un fluorímetro.

(c) Se dispone de varias etiquetas enzima-sustrato, y la Patente de los Estados Unidos No. 4,275,149 ofrece una reseña de algunas de éstas. Por lo general, la enzima cataliza una alteración química del sustrato cromógeno que puede medirse utilizando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en el sustrato, el cual puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminescente se excita electrónicamente mediante una reacción química y puede entonces emitir luz, la cual puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de etiquetas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de los Estados Unidos No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato dehidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa,

66
75
69

lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como ureasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O' Sullivan et al. (1981) *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (ed J. Langone and H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166.

Ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

- (i) Peroxidasa de rábano (HRPO) con peróxido de hidrógeno como sustrato, en donde la peroxidasa de rábano oxida un precursor colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));
- (ii) Fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromógeno; y
- (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromógeno (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorógeno 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

Se encuentran disponibles otras numerosas combinaciones enzima-sustrato para los expertos en el arte. Para una reseña general de éstas, véase las Patentes de los Estados Unidos No. 4,275,149 y 4,318,980.

A veces, la etiqueta se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El artesano experto será conocedor de varias técnicas para lograrlo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina, y cualquiera de las tres amplias categorías de etiquetas ya mencionadas puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, por lo tanto, la etiqueta puede conjugarse con el anticuerpo en esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno (por ejemplo, digoxina), y uno de los diferentes tipos de etiquetas ya mencionados se conjuga con un anticuerpo

67
20
70

anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por consiguiente, puede lograrse la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo.

En otra incorporación de la invención, el anticuerpo no necesita etiquetarse, y su presencia puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de análisis conocido, tal como análisis de unión competitiva, análisis directos e indirectos sandwich, y análisis de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Los análisis de unión competitiva se basan en la capacidad de un estándar etiquetado de competir con la sustancia de la muestra de prueba ("***the test sample analyze***") en cuanto a la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de antígeno en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad que se une, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición, de modo que el estándar y la sustancia que se unen a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del estándar y la sustancia que quedaron sin unirse.

Análisis sandwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunógena diferente, o epítipo, de la proteína a detectarse. En un análisis sandwich, la sustancia de la muestra de prueba se une por un primer anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido y, posteriormente, un segundo anticuerpo se une a la sustancia, formando así un complejo insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,376,110. El segundo anticuerpo puede etiquetarse él mismo con una fracción detectable (análisis directo sandwich) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se etiqueta con una fracción detectable (análisis indirecto sandwich). Por ejemplo, un tipo de análisis sandwich es un análisis ELISA, en el cual la fracción detectable es una enzima.

68
27
51

Para inmunohistoquímica, la muestra del tumor puede ser fresca o congelada o puede incrustarse en parafina y fijarse con un preservante tal como, por ejemplo.

Los anticuerpos pueden usarse asimismo en análisis diagnósticos *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo se etiqueta con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) o un colorante de modo que el tumor pueda localizarse usando inmunoescintigrafía.

En una incorporación, un método de detectar NRP1 en una muestra biológica (por ejemplo, tejido, sangre, sueros, líquido cefalorraquídeo) o una muestra biológica preparada puede incluir el paso de contactar un anticuerpo de esta invención con la muestra y observar el anticuerpo anti-NRP1 unido al NRP1 en la muestra o determinar la cantidad del anticuerpo anti-NRP1 unido a NRP1 en la muestra. En otra incorporación, un método de detectar NRP1 en un sujeto incluye el paso de administrar un anticuerpo de esta invención al sujeto y observar el anticuerpo anti-NRP1 ligado al NRP1 en el sujeto o determinar la cantidad del anticuerpo anti-NRP1 unido a NRP1 en el sujeto (por ejemplo, humano, ratón, conejo, rata, etc).

Kits de Diagnóstico

Por cuestiones de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención puede suministrarse en un kit, es decir, una combinación empacada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo el análisis diagnóstico. Donde el anticuerpo está etiquetado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor sustrato que proporcione el cromóforo o fluoróforo detectable). Asimismo, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o amortiguador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diferentes reactivos pueden variarse ampliamente para permitir concentraciones en solución de los reactivos, que sustancialmente optimicen la sensibilidad del análisis. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse en la forma de polvos secos, usualmente liofilizados, incluidos excipientes que al disolverse suministrarán una solución de reactivos con la concentración apropiada.

Artículos de Fabricación

En otra incorporación de la invención, se provee un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los desórdenes descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto de envase sobre el recipiente o asociado con él. Recipientes apropiados incluyen, por ejemplo, frascos, frasquitos, jeringas y tubos de ensayo, etc. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente comprende o contiene una composición que es efectiva para tratar la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa con solución intravenosa o un frasquito con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo. La etiqueta sobre el envase o asociada con él indica que la composición se utiliza para tratar la enfermedad de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que contenga un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina amortiguada con fosfato, solución salina de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir asimismo otros materiales deseables desde un punto de vista comercial, incluidos otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos de envase con instrucciones de empleo.

Los siguientes ejemplos tienen como única finalidad ilustrar la práctica de la presente invención y no se exponen dan a modo de limitación. Las divulgaciones de todas las patentes y literaturas científicas citadas en esta solicitud se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación de Anticuerpos Anti-NRP1

A. Generación de Bibliotecas de Anticuerpos en Bacteriófagos

Una variedad de métodos son conocidos en el arte para generar bibliotecas de anticuerpos desplegados utilizando otras tecnologías. Una de las ventajas de estas bibliotecas, comparadas con las tecnologías convencionales de hibridoma, es que son muy apropiadas para generar anticuerpos funcionales de especies cruzadas, porque permiten la selección e identificación sistemática *in vitro* sin la

70
71
73

introducción de tolerancia inmunitaria. Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; Bradbury and Marks (2004) *J Immunol Methods* 290:29-49.

En general, se han desarrollado dos tipos de bibliotecas combinatorias de anticuerpos, distinguidas por la fuente de los repertorios. La mayoría de las bibliotecas a la fecha son bibliotecas de anticuerpos "naturales" que utilizan los repertorios naturales como la fuente de su diversidad, donde los genes como ARN mensajero de células inmunitarias de animales no sometidos a tratamiento previo o inmunizados ("**naïve or immunized animals**") o humano se amplifican y clonan en un vector para exposición en bacteriófagos u otra tecnología de exposición, tales como exposición en ribosomas o levaduras. Habitualmente los anticuerpos naturales tienen múltiples estructuras básicas, que junto con secuencias de CDRs variables y la recombinación de cadena ligera y cadena pesada constituyen la diversidad de la biblioteca. El tamaño de la biblioteca determina el desempeño de las bibliotecas puesto que los repertorios son en general más grandes que el tamaño de las bibliotecas. La biblioteca sintética, de otro lado, es una nueva rama de la biblioteca donde la diversidad se diseña y se incorpora en la biblioteca con ADN sintético. Se han empleado estructuras básicas únicas o múltiples. Para una biblioteca de estructuras básicas únicas, la fuente de la diversidad depende únicamente de la degradación del ADN sintético diseñado para crear los diversos bucles CDR. Tanto el diseño de diversidad como el tamaño de las bibliotecas son críticos para el desempeño de la biblioteca, el cual puede medirse por la afinidad de los anticuerpos hallados de las bibliotecas. Knappik et al. (2000) *J Mol Biol* 296:57-86; Sheets et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6157-6162; de Haard et al. (1999) *J Biol Chem* 274:18218-18230.

Introduciendo diversidad sintética en posiciones expuestas a disolvente en las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada variable (CDRs), Lee et al. desarrollaron una biblioteca de anticuerpos sintéticos expuestos en bacteriófagos, contruidos en una única estructura básica humana (VL_{kappa} I, VH_{subgrupo III}). Sidhu et al. (2004) *J Mol Biol* 338:299-310; Lee et al. (2004) *J Mol Biol* 340:1073-1093; Carter et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289. Esta "biblioteca VH" se desplegó como un fragmento de unión a antígeno bivalente (Fab'2) y utilizó codones hechos a la medida para imitar la diversidad natural observada en inmunoglobulina humana. Lee et al. (2004) *J Immunol Methods* 284: 119-132. Aunque la biblioteca VH se desempeñó bien tal como se

medió por la afinidad y función de anticuerpos derivados, pueden ser deseables modificaciones adicionales en el diseño de la biblioteca para generar anticuerpos funcionales de ciertos antígenos diana de interés. La reciente disponibilidad de trinucleótidos para la síntesis de oligonucleótidos permitió la posibilidad de aumentar la diversidad de aminoácidos sin incrementar la diversidad del ADN. Se generó así una nueva biblioteca VH/VL, como se describe en esta solicitud, en donde las posiciones altamente variables en CDR-L3 se diversificaron aún más, puesto que CDR-H3 y CDR-L3 forman la esfera interna del sitio de unión a antígeno. Mian et al. (1991) *J Mol Biol* 217:133-151.

Materiales y Métodos

El molde de la biblioteca sin contacto previo con antígeno VH/VL ("**VH/VL naïve library template**") con CDR-L1, -L2, -L3, -H1 y -H2 de consenso se generó usando mutagénesis dirigida por oligonucleótido en el fagémido pV0350-4 con codones de terminación en CDR-H3 y desplegando bivalentemente en las superficies de partículas del bacteriófago M13. Lee et al. (2004) *J Mol Biol* 340: 1073-1093. Se construyeron bibliotecas de exposición en bacteriófagos empleando el método de mutagénesis de Kunkel, como se describe (Kunkel et al. (1991) *Methods Enzymol* 204:125-139), con una mezcla de oligonucleótidos mutagénicos, diseñados para introducir mutaciones en los sitios designados en CDR-L3, H1, H2 y H3 y codones de terminación CDR-H3 de reparación. Las reacciones de mutagénesis (~10µg DNA) se electroporaron en células SS320 de *E. coli* (~10¹¹ células), como se describe (Sidhu et al. (2004)).

Resultados

La biblioteca VH/VL descrita aquí utilizó la estructura básica VL_{kappa} I y VH_{subgrupo III} derivada de Herceptin® como se usó para la biblioteca VH, que ha demostrado desplegarse bien en bacteriófago, expresarse bien en *E. coli*, y que puede convertirse rápidamente en IgG de longitud total que se expresa bien en células mamíferas. Lee et al. (2004) *J Mol Biol* 340:1073-1093; Carter et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285- 4289. Las bibliotecas se desplegaron en la superficie del bacteriófago como un Fab (Fab'₂) bivalente fusionándose a la cápside del bacteriófago P3. Esta exposición divalente se hizo con la intención de aumentar las afinidades de unión aparentes a antígenos inmovilizados y ayudar a

72
81
25

mejorar la recuperación de clones de anticuerpos en bacteriófagos raros o de baja afinidad.

Par evitar desfases potenciales heredados de las secuencias CDR derivadas de Herceptin® mantenidas en la cadena ligera de la biblioteca VH, se introdujeron secuencias CDR kappa de consenso en el molde para la biblioteca VH/VL. Residuos CDR de consenso se determinan seleccionando los aminoácidos más prevalentes que existen en anticuerpos humanos naturales. Los codones de terminación, empleados previamente en la cadena pesada de la biblioteca VH para garantizar la mutagénesis en todas las 3 CDRs, se reemplazaron análogamente con secuencias del subgrupo DI de consenso para CDR-H1 y CDR-H2. Las secuencias CDR de consenso representan el ácido más prevalente en cada posición. CDR-H3 juega un papel dominante en el reconocimiento de antígeno; por consiguiente, varios codones de terminación se pusieron en H3 para garantizar que los clones del anticuerpo funcional de las bibliotecas fueran diferentes entre sí. Xu et al. (2000) *Immunity* 13: 37-45. Se esperaba que la presencia de secuencias CDR humanas de consenso permitiera que variantes parcialmente mutadas (no todas las CDRs tomadas como dianas se cambiaron) se desplegaran y permanecieran potencialmente funcionales en la unión. De este modo el diseño VH/VL tiene la ventaja de aumentar la proporción de clones funcionales de anticuerpos en bacteriógrafos en la biblioteca. Las secuencias CDR usadas fueron SISSYL para CDR-L1 (posiciones 28-33), GASSRA para CDR-L2 (posiciones 50-55), YYSSPL para CDR-L3 (posiciones 91-96), FTFSSYAMS para CDR-H1 (posiciones 27-35), y RISPSGGSTY para CDR-H2 (posiciones 50-58), y WXXXRPXXMDY para CDR-H3 (posiciones 95-102, X es un codón de terminación) como se muestra en la Tabla I. La prevalencia de cada posición en anticuerpos humanos se muestra también en la Tabla I.

Se introdujo diversidad en la biblioteca VH/VL en un subconjunto de posiciones CDR basándose en su alta exposición a disolvente y/o variabilidad especialmente alta entre secuencias de anticuerpos naturales. Las posiciones seleccionadas para mutagénesis y la diversidad que se introdujo se muestran en la Tabla H. Por ejemplo, en CDR-H1, las posiciones 27, 28, 30, 31, 32, 33 y 34 se eligieron para diversificar. Para el diseño de la biblioteca VH/VL, codones oligo degenerados o trinucleótidos se utilizaron para guiar la diversidad en cada posición, de modo que se estuvieran representados los aminoácidos más

77
82
76

prevalentes. Por ejemplo, en CDR-H1 (posición 30), serina representa alrededor del 50% de la diversidad natural, de modo que se empleó una mezcla de trinucleótidos (X1) que tenían aproximadamente 52% de serina y 2.5% de otros aminoácidos, excepto cisteína.

CDR-H3 y CDR-L3 forman el centro del sitio de unión a antígeno y, en consecuencia, muestran la frecuencia más alta de contactos de antígeno en complejos anticuerpo-antígeno estructuralmente conocidos. Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877-883. Se aleatorizaron cinco residuos en CDR-L3 (Tabla II) con la variabilidad más alta. En general, CDR-H3 es la más diversa en términos de longitud, secuencia y estructura y es un componente clave de la diversidad en anticuerpos naturales. Xu and Davis (2000) *Immunity* 13:37-45; Wu et al. (1993) *Proteins* 16:1-7. Por lo tanto, se construyeron 12 sub-bibliotecas con diferentes longitudes CDR-H3 que variaba desde 9 a 20 aminoácidos. Combinadas, estas sub-bibliotecas cubren aproximadamente 90% de la variación de longitud CDR-H3 en anticuerpos naturales. Se sintetizaron oligonucleótidos que codifican CDR-H3 usando codones de trinucleótido. Esto nos permitió eliminar fácilmente cisteína (rara en CDR-H3), y aumentar los niveles de glicina, tirosina y serina, los residuos más abundantes en CDR-H3. Mian et al. (1991) *J Mol Biol* 217:133-151. El codón X7, una mezcla de trinucleótidos de alrededor de 15.6% de serina, tirosina y glicina cada uno, con 3.1% cada uno de los restantes aminoácidos excepto cisteína, se utilizó para cada posición en CDR-H3 (cálculos teóricos para todas las mezclas de trinucleótidos). Se utilizaron igualmente diferentes combinaciones de trinucleótidos en posiciones seleccionadas de CDR-H1, H2, H3, y L3. Como se muestra en la Tabla II y la Tabla Complementaria Tabla I, los codones X1 a X6 tienen un alto porcentaje de serina, tirosina, o glicina. X1 tiene 52.5% de serina, X2 tiene 52.5% de tirosina, X3 tiene 10% de tirosina, glicina o serina, X4 tiene 28.8% de glicina, X5 tiene 19.2% de tirosina, glicina o serina, y X6 tiene 20% de tirosina o serina. Se calculó que la biblioteca de anticuerpos en bacteriófagos VH/VL tenía aproximadamente 10^{10} variantes desplegadas.

Tabla I. Secuencia consenso o CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1 y CDR-H2 en el molde de la biblioteca VH/VL. Los residuos de la CDR de consenso se determinan seleccionando los aminoácidos de más prevalencia existentes en anticuerpos humanos naturales. Se muestra la prevalencia (%) de cada residuo en anticuerpos humanos en una posición dada, que se calcula de la alineación de

77
83
72

aproximadamente 1600 secuencias de cadena ligera humanas y 3500 secuencias de cadena pesada humanas en la base de datos de Kabat (Kabat et al. (1977) *J Biol Chem* 252:6609-6616).

CDRs	Posiciones	Residuos	Prevalencia en anticuerpos humanos naturales (%)
CDR-L1	28	S	33
	29	I	40
	30	S	55
	31	S	44
	32	Y	67
	33	L	94
CDR-L2	50	G	25
	51	A	79
	52	S	95
	53	S	36
	54	R	60
	55	A	45
CDR-L3	91	Y	54
	92	Y	23
	93	S	46
	94	S	24
	95	P	80
	96	L	22
CDR-H1	27	F	45
	28	T	54
	29	F	73
	30	S	68
	31	S	50
	32	Y	64
	33	A	22
	34	M	46
	35	S	34
CDR-H2	50	R	17
	51	I	84

35
21
28

52	S	26
52a	P	29
53	S	24
54	G	37
55	G	53
56	S	28
57	T	56
58	Y	32

Tabla II. Diversidad diseñada de CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 para la biblioteca VH/VL. Se relacionan posiciones CDR elegidas para aleatorización en CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 con residuos de consenso en el molde de la biblioteca. La diversidad diseñada es un grupo de residuos codificados por un codón degradado elaborado a la medida (*cursiva*) o 19 aminoácidos sin cisteína codificados por mezclas de codón de trinucleótidos (texto en **negrilla**), de modo que el porcentaje de tipos de aminoácidos codificados en cada posición era cercano o más alto que el 50% de los tipos de aminoácidos hallados en la base de datos. Para posiciones particulares, todos los 19 aminoácidos sin cisteína se introducen usando mezclas de codón de trinucleótidos con diferente desfase hacia Tyr (Y), Gly (G) y Ser (S).

176
88
79

CDRs	Posiciones	Diversidad de diseño					Cobertura de diversidad natural (%)
		Codón	Residuos codificados (%)				
			Y	G	S	otros (-Cys)	
CDR-L3	Y91	TAC	100	-	-	-	77
		MGC	-	-	-	R/S(50)	
	Y92	X5	19.2	19.2	19.2	2.5	100
	S93	X1	2.5	2.5	52.5	2.5	100
	S94	X6	20	3.3	20	3.3	100
	L96	NTC	-	-	-	F/I/L/V(25)	45
CDR-H1	F27	TWC	50	-	-	F(50)	65
	T28	ASC	-	-	50	T(50)	90
	S30	ASC	-	-	50	T(50)	86
	S31	X1	2.5	2.5	52.5	2.5	100
	Y32	X2	52.5	2.5	2.5	2.5	100
	A33	X7	15.6	15.6	15.6	3.1	100
	M34	ATS	-	-	-	M/I(50)	67
	CDR-H2	R50	X3	5	5	5	5
S52		X6	20	3.3	20	3.3	100
P52a		CCT	-	-	-	P(100)	100
		X7	15.6	15.6	15.6	3.1	
S53		X7	15.6	15.6	15.6	3.1	100
G54		RRC	-	-	25	D/G/N(25)	81
S56		DMT	16.6	-	16.6	A/D/N/T(16.6)	81
Y58		DAC	33.3	-	-	D/N(33.3)	70
CDR-H3	95	X4	3.8	28.8	3.8	3.8	100
	96	X4	3.8	28.8	3.8	3.8	100
	97~100k	(X7)4~15	15.6	15.6	15.6	3.1	>98
	100l	X7	15.6	15.6	15.6	3.1	100
		GBT	-	33.3	-	A/V(33.3)	
	100m	TTC	-	-	-	F(100)	89
		ATG	-	-	-	M(100)	
	101	GAT	-	-	-	D(100)	92
	102	TAC	100	-	-	-	67
		GTC	-	-	-	V(100)	

B. Generación de anticuerpos anti-NRP1 monoclonales derivados de bacteriófago

Materiales y Métodos

Clasificación e identificación sistemática de bibliotecas para detectar anticuerpos anti-NRP1 – Constructos NRP1 humanos y murinos (1-641aa) se clonaron en un vector de expresión mamífero, y se expresaron en células CHO. Formas truncadas de los dominios NRP-1, a1a2 y b1b2 se expresaron en

27
16
80

baculovirus. Inmunoplasmas NUNC 96 well Maxisorp se recubrieron de un día para otro a 4° C con antígeno diana (10ug/ml) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura de la sala con amortiguador de bloqueo de bacteriófago PBST (PBS y 1% BSA y 0.05% Tween 20). Las bibliotecas de exposición de anticuerpos en bacteriófagos se agregaron a placas de antígeno y se incubaron de un día para otro a temperatura de la sala (RT). Al día siguiente, placas recubiertas con antígeno se lavaron 10 veces con PBT (PBS con 0.05% T-20), y los bacteriófagos unidos se eluyeron con 50mM HCl y 500mM NaCl durante 30 minutos y se neutralizaron con un volumen igual de 1M Tris base pH7.5. El bacteriófago recuperado se amplificó en células XL-1 Blue de *E. coli*. Durante las rondas subsiguientes de selección, la incubación de bacteriófago de anticuerpo con las placas recubiertas con antígeno se redujo a 2-3 horas, y gradualmente se aumentó el rigor del lavado de la placa.

Afinidad de unión, especificidad y análisis de citometría de flujo de anticuerpos anti-NRP1 - Los valores IC₅₀ del anticuerpo en bacteriófago se determinaron usando ELISA de unión a bacteriófago competitiva, como se describe. Lee et al. (2004) *J Mol Biol* 340:1073-1093. Las curvas de competición se ajustaron con el programa de ajuste de curvas de regresión no lineal de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software) para determinar los valores IC₅₀, los cuales se calcularon como la concentración de antígeno en la etapa de unión en solución que inhibió el 50% del anticuerpo desplegado en bacteriófago de unirse al antígeno inmovilizado.

Clones de interés se reformatearon luego en IgGs clonando la región V_L V_H de clones individuales en vector LPG3 y LPG4 respectivamente (Carter et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-4289), expresado transitoriamente en células mamíferas, y se purificaron con columnas de proteína A. Para las determinaciones de afinidad de unión de IgGs anti-NRP1 se empleó medición de resonancia de plasmones superficiales (SPR) con un instrumento BIAcore™-3000. IgGs anti-NRP1 se acoplaron a chips biosensores CM5 activados para obtener aproximadamente 500 unidades de respuesta (RU), seguidas bloqueo de los grupos que no reaccionaron con 1M etanolamina. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie dobles de Neuropilina (0.7 a 500 nM) en amortiguador PBST a 25°C con un caudal de 30μl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo de unión de

7.8
8.1

Langmuir uno a uno simple (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} .

Para pruebas de especificidad de unión, 10 µg/ml de IgGs en amortiguador PBST se incubaron con placas Maxisorp de 96 pocillos, recubiertas con 2 µg/ml de antígeno durante por lo menos 1 hora, y las placas se lavaron con amortiguador PBT. Los anticuerpos unidos se detectaron con conjugados HRP de anticuerpo anti-humano, desarrollados con sustrato TMB durante aproximadamente 5 minutos, extinguidos con 1M H_3PO_4 , y se leyeron espectrofotométricamente a 450 nm.

Para análisis de citometría de flujo, células HUVEC se desprendieron de los frascos de cultivo de tejido con amortiguador de disociación de células. Las células disociadas se lavaron en PBS y se re-suspendieron en PBS que contenía 2% de Suero Fetal Bovino (amortiguador FACS). Las células se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpos anti-NRP1 o anticuerpo de control (anti-IgE) en amortiguador FACS sobre hielo durante 30 minutos. Seguidamente las células se lavaron dos veces en PBS, y se colorearon en amortiguador FACS con IgG anti-humana en cabra PE-Fab'₂, anticuerpo específico Fc sobre hielo durante 30 minutos. Luego de dos lavados con PBS, las células se re-suspendieron en 200 µl de amortiguador FACS y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS caliber, Benton Dickenson, Mountain View, CA) usando software Cell-Quest.

Resultados

Las 12 sub-bibliotecas VH/VL se cribaron individualmente ("**were individually panned**") contra proteína hNRP1 (a1a2b1b2)-Fc expresada en células CHO inmovilizadas para la primera ronda de selección. Bacteriófagos eluidos de cada sub-biblioteca se amplificaron y luego se combinaron para una segunda ronda de selección. Puesto que hNRP1-Fc se utilizó como el antígeno, el bacteriófago agrupado se pre-absorbió con un exceso de proteína de fusión Fc irrelevante luego de la primera ronda de cribado para minimizar la recuperación de anticuerpos en bacteriófago anti-Fc. Luego de la cuarta ronda de cribado, 95 clones de bacteriófago escogidos aleatoriamente se evaluaron con respecto a la capacidad de unirse específicamente a NRP1. Noventa por ciento (90%) de los

79
48
82

clones fueron positivos para unión hNRP1 y 40% de los clones positivos fijaron NRP1 humano y murino.

Los clones del bacteriófago se secuenciaron, y 10 clones únicos se escogieron para posterior caracterización. Todos se unieron a NRP1 humano y murino con una IC₅₀ por debajo de 70 nM en el ELISA del bacteriófago. El clon YW64.3 se unió a NRP1 humano y murino con una IC₅₀ de 0.5 y 3.4 nM, respectivamente (Tabla TS). Las secuencias de los 10 clones reflejan el diseño de la biblioteca VH/VL con longitudes CDR-H3 variables varios cambios distribuidos a todo lo largo de CDR-H1, H2 y L3, si bien se conservan algunas secuencias CDR de consenso del molde de la biblioteca. Los clones 64.3 y 64.29 tienen cambios en todas las 4 CDRs y poseen además las mejores afinidades de unión al NRP1 tanto humano como murino (Tabla III).

Tabla III. Secuencias CDR parciales y afinidad de unión (IC₅₀ del bacteriófago) para anticuerpos anti-NRP1. Sólo se muestran secuencias de aminoácidos CDR en posiciones aleatorizadas de 11 diferentes clones de bacteriófago identificados de la biblioteca VH/VL. Las afinidades como valores IC₅₀ con hNRP1 y mNRP1 se midieron con ELISA de bacteriófago competitivo.

Clon	CDR-L3 Parcial (91-96)	SEQ ID NO:	CDR-H1 Parcial (27-34)	SEQ ID NO:	CDR-H2 Parcial (50-58)	SEQ ID NO:	CDR-H3 Parcial (95-102)	SEQ ID NO:
YW64.3	YMSV PI	7	FSFSS EPI	18	SITGK NGYY	29	WGKK VYG--- MDV	40
YW 64.4	YYSSP L	8	FTFSS YAM	19	SIAGS GGYY	30	WGGS NGSG- ---FDY	41
YW 64.14	YYSSP L	9	YSFSS HMM	20	SIYPP GGYY	31	WGSR SPG--- -MDV	42
YW 64.23	YYSSP L	10	FTFSS YAM	21	TIIPHG GYY	32	WAKR SYG--- MDV	43
YW 64.28	YYSSP L	11	FTFSS YAM	22	WISPL NGYY	33	WGRR YIG---- MDV	44
YW 64.29	RYSVP I	12	FTFSS YQL	23	SIF- SGGY Y	34	YGNH V -----	45

80
84
83

YW 64.30	YYSSP L	13	FTFSS YAM	24	SISRG DGY Y	35	WAGG SA---- MDV	46
YW 64.47	YYSSP L	14	FTFSQ YSI	25	TIYPF GGY Y	36	FGQS YYGG SYAM DV	47
YW 64.53	YYSSP L	15	FTFTS RTM	26	SIS- SGGY Y	37	WESY YG-----	48
YW 64.55	YYSSP L	16	FTFSS YAM	27	SIYST GGY Y	38	WGYP G---- MDV	49
YW 107.4	YYSSP L	17	FTFSS YAM	28	QISPA GGY N	39	ELPYY RMSK V-MDV	50

Clon	IC50 (nM)	
	mNRP1	hNRP1
YW64.3	3.4±0.9	0.48±0.02
YW64.4	35±9.6	24±7.4
YW 64.14	11±3.4	5.2±0.9
YW 64.23	46±21	47±14
YW 64.28	7.9±1	1.2±0.2
YW 64.29	9.9±4.2	2.7±0.1
YW 64.30	60±11	50±19
YW 64.47	67±25	21±6
YW 64.53	16±2.9	4±0.6
YW 64.55	17±5.8	3.9±1
YW 107.4	38±20	6.1±1

Variantes truncadas de dominio de hNRP1 se emplearon para identificar el epítipo de unión para estos clones y todos se mapearon al dominio a1a2 de hNRP1. Para seleccionar anticuerpos de bacteriófago que se unieron al dominio b1b2 de NRP1 y bloquear potencialmente la unión de VEGF, iniciamos un nuevo proceso de cribado usando hNRP1 (b1b2)-His expresado en baculovirus como un antígeno inmovilizado. Luego de 4 rondas de selección, tan sólo un clon único, YW107.4, se identificó que se unió a NRP1 humano y murino. YW107.4 se unió a

81
60
80

NRP1 humano y murino con una IC_{50} de 6 y 38 nM en el ELISA de Bacteriófago (Tabla III).

Caracterización de IgG anti-NRP1seleccionada – Clones anti-NRP1 seleccionados de la Tabla III se reformatearon en IgG1 de longitud completa, expresada en células CHO y se purificaron para caracterización posterior. Los anticuerpos en bacteriófago anti-NRP1 YW64.3 y YW107.4 se unieron específicamente a NRP1 humano y murino y no se unieron a NRP-2 humano o murino, ErbB2-ECD o BSA. Figure 1A. Cada uno de los otros ocho anticuerpos en bacteriófago mostró una especificidad similar. Mediante resonancia de plasmones superficiales, IgG YW64.3 y YW107.4 inmovilizada no interactuó con estos antígenos en concentraciones hasta 500 nM. No obstante, los dos YW64.3 y YW107.4 unieron NRP1 humano con una K_d de 0.9 y 5 nM, así como NRP1 murino con una K_d de 7.8 y 11 nM, respectivamente. Aunque estos anticuerpos se seleccionaron usando antígeno inmovilizado en placa, el análisis FACS demostró que todas las IgGs purificadas se unieron también a células HUVEC, que expresan hNRP1 endógenamente (por ejemplo YW64.3 y YW107.4 mostrados en Figura 1B).

C. Maduración por Afinidad de Anticuerpos anti-NRP1

YW107.4 se unió al dominio b1b2 de NRP1 humano y murino con una IC_{50} de bacteriófago de 6 y 38 nM, respectivamente (Tabla III). Para aumentar la potencia *in vivo*, este clon se maduró por afinidad usando NRP1-His humano.

Materiales y Métodos

Para generar el molde de la biblioteca para maduración por afinidad del clon YW107.4, la cremallera de leucina GCN4 del fagémido progenitor se retiró primeramente usando mutagénesis de Kunkel para permitir un formato Fab de despliegue monovalente. Se incorporó un codón de terminación en CDR-L3. Se empleó una estrategia de aleatorización suave ("**a soft randomization strategy**") para la maduración por afinidad, que introdujo el índice de mutación de aproximadamente 50% en las posiciones seleccionadas mediante la síntesis de ADN mutagénico con mezclas 70-10-10-10 de bases que favorecen los nucleótidos naturales. Gallop et al. (1994) *J Med Chem* 37:1233-1251. Se

82
91
88

generaron tres bibliotecas diferentes con combinaciones de bucles CDR, aleatorización L1/L2/L3, L3/H1/H2 y L3/H3, a través de residuos seleccionados con aleatorización suave en las posiciones 28-32 de CDR-L1, 50 y 53-55 de CDR-L2, 91, 92, 93, 94 y 96 de CDR- L3, 28-35 de CDR-H1, 50-58 de CDR-H2, y 95-100 de CDR-H3.

Para seleccionar clones madurados por afinidad, bibliotecas de bacteriófagos se sometieron a clasificación de placa para la primera ronda y se siguieron por cuatro rondas de clasificación de fase en solución, como se describe. Lee et al. (2004) *J Mol Biol* 340:1073-1093. En la primera ronda de clasificación de placa, se agregaron tres bibliotecas a la placa recubierta con hNRP1 en forma separada durante 1 hora a 37°C. Luego de eso, se realizaron cuatro rondas de clasificación de de fase en solución para aumentar la eficiencia de la selección basada en afinidad con restricción creciente en la siguiente forma: ronda 2 (5nM hNRP1 biotinilado), ronda 3 (1nM de hNRP1 biotinilado), ronda 4 (0.5nM de hNRP1 biotinilado y 250nM de competidor hNRP1 no biotinilado a 37°C durante 1 hora) y ronda 5 (0.5nM de hNRP1 biotinilado y 500nM de competidor hNRP1 no biotinilado a 37°C durante 3 horas). Durante el proceso de selección, se incluyó la reacción sin hNRP1 biotinilado y sirvió como unión de bacteriófago de fondo para calcular el enriquecimiento de cada ronda de cribado.

Luego de cinco rondas de cribado, se empleó un ELISA de bacteriófago competitivo de punto único de alto rendimiento para cribar rápidamente clones de alta afinidad, como se describe. Sidhu et al. (2004) *J Mol. Biol* 338:299-310. Se seleccionaron para caracterización posterior clones con baja relación de la absorbencia a 450nm en la presencia de 5nM hNRP1 a la en ausencia de hNRP1.

Resultados

Tres diferentes combinaciones CDR, L1/L2/L3, L3/H1/H2 y L3/H3, se eligieron para aleatorización usando una estrategia de 'aleatorización suave' que mantiene un desfase de secuencia natural, de modo que posiciones seleccionadas se mutan únicamente 50% del tiempo. Gallop et al. (1994) *J Med Chem* 37:1233-1251. Para maduración por afinidad, el Fab monovalente se desplegó en bacteriófago en lugar de Fab bi-valente para reducir la avidez potencial durante la selección. Se introdujeron codones de terminación en CDR-L3 en cada sub-

93-
42
86

biblioteca. Estrategias de selección de disociación ("**off-rate selection strategies**") (véase Métodos) se emplearon para mejorar la afinidad de YW107.4, puesto que ya poseía una constante tasa de asociación relativamente alta (2.2×10^5), pero la constante de tasa de disociación (1.1×10^{-3}) fue relativamente rápida (Tabla V).

En la primera ronda de selección, todas las 3 bibliotecas con aleatorización suave CDR se cribaron/tamizaron contra hNRP1 inmovilizado, seguido por rondas subsiguientes con una estrategia de clasificación fase-solución para limitar la concentración diana y aumentar la selección basada en afinidad. La concentración de hNRP1 biotinilado se redujo gradualmente de 5 a 0.5 nM y se agregó un exceso de 500 veces de hNRP1 no biotinilado para competir por enlazantes de disociación rápida. La mezcla se incubó igualmente a 37°C durante hasta 2 horas.

La biblioteca L1/L2/L3 mostró un enriquecimiento significativo luego de la ronda 5. Noventa y seis clones se eligieron aleatoriamente, se secuenciaron y luego se clasificaron las afinidades. Veintitrés clones de bacteriófago único se seleccionaron y se purificaron para posterior caracterización. La mayoría de los clones tuvieron una afinidad mejorada para hNRP1 como se determinó por ELISA de competición de bacteriófago. Sorpresivamente, la afinidad para mNRP1 se mejoró asimismo a pesar de haberse omitido del proceso de selección, sugiriendo que los clones se unieron a un epítipo conservado. Clones seleccionados tuvieron 4 a 7 cambios en las 3 CDRs de cadena ligera; posiciones 28 y 30 en CDR-L1 tendieron a sustituirse con tirosina e histidina, respectivamente, mientras que las posiciones 92, 93, y 96 en CDR-L3 fueron más diversas (Tabla IV).

Clones con altísima afinidad por los dos NRP1 humano y murino (YW107.4.18, YW107.4.38, YW107.4.52, YW107.4.63, YW107.4.76a y YW107.4.87) se re-formatearon y se expresaron como anticuerpos de longitud completa. Todas las 6 IgGs tuvieron una afinidad mejorada para hNRP1 y mantuvieron el bloqueo completo de la unión VEGF-A. Afinidades para NRP1 humano y murine variaron de 0.4 a 1.8 nM (Tabla V). Se mejoró la constante de tasa de disociación de YW107.4.87 llevando a una mejora general en afinidad de alrededor de 10 veces para los dos NRP1 humano y murino; no se observó unión

84
43
82

al NRP2 humano o murino (Figura 2A). YW107.4.87 mostró también una unión mejorada a NRP1 de la superficie celular (Figura 2B).

Tabla IV. Secuencias CDR y afinidad de unión (IC₅₀ del bacteriófago) para clones YW107.4 de afinidad mejorada.

Se muestran las secuencias de aminoácidos deducidos de clones YW 107.4 madurados por afinidad en las posiciones CDR de cadena ligera aleatorizadas. Los valores IC₅₀ Fab-bacteriófago del clon individual contra hNRP1 y mNRP1 de ELISA de bacteriófago de competición se utilizaron para comparar la mejora de afinidad con el YW107.4.

Clon	CDR-L1 Parcial (28-32)	SEQ ID NO:	CDR-L2 Parcial (50-55)	SEQ ID NO:	CDR-L3 Parcial (92-95)	SEQ ID NO:	IC50 (nM)	
							mNRP1	hNRP1
YW107.4	SISSY	51	GASSR A	75	YSSP L	99	38±20	6.1±1
YW107.4.33a	YISSY	52	GASRR A	76	IGSPI	100	1.5 ±0.4	0.31 ±0.04
YW107.4.53	YISSY	53	GASRR E	77	LNSPL	101	1.7 ±0.1	0.30 ±0.02
YW107.4.66	YISSY	54	GASSR A	78	IVSPL	102	2.6 ± 0.6	0.45 ± 0.02
YW107.4.76a	YISSY	55	GASRR A	79	LRSP H	103	0.8 ± 0.4	0.23 ± 0.01
YW107.4.78	YISSY	56	GASSR E	80	LSSPI	104	1.7 ± 0.2	0.30 ±0.02
YW107.4.85	YISSY	57	GASSG E	81	IISPI	105	4 ± 0.7	0.44 ± 0.06
YW107.4.51	RISSY	58	GASRR E	82	KLSP	106	12±6	2 ±0.5
YW107.4.58	YISSY	59	GASSR A	83	KSSP R	107	3.5 ± 1.5	0.73±0.2 8
YW107.4.42	WIHSY	60	GASSS A	84	YSSP L	108	1.2 ±2.2	0.81 ±0.09
YW107.4.59	RIHSY	61	GASSR A	85	YISPL	109	26 ± 14	1.8±0.7
YW107.4.	YIHSY	62	GASRR	86	YGTP	110	7.8 ±2	0.58 ±

89
40
88

33b			A		H			0.07
YW107.4.54	PLHSY	63	GASSR A	87	YRSP L	111	2.7 ± 1	0.84 ±0.05
YW107.4.63	YLSSY	64	GASSS E	88	ISVPL	112	0.8 ± 0.1	0.15 ±0.01
YW107.4.38	YLSSY	65	GASSR A	89	LRSPI	113	1.4 ± 0.3	0.28 ±0.01
YW107.4.18	YFSSY	66	GASTH E	90	IRSPL	114	1.1 ± 0.3	0.21 ±0.02
YW107.4.52	YFSSY	67	GASTL A	91	IRSPL	115	1.1 ± 0.3	0.22 ±0.04
YW107.4.87	YFSSY	68	GASSR A	92	LGSP P	116	1.5 ± 0.2	0.21 ±0.04
YW107.4.55	LTHSY	69	GASSR A	93	YSSP L	117	2 ± 2.4	0.93 ±0.05
YW107.4.20	RTHS Y	70	GASSR A	94	YGSP H	118	33	0.45 ±0.06
YW107.4.12	YTHS Y	71	GASSR A	95	YSSPI	119	3.4 ± 0.6	0.10 ± 0.02
YW107.4.17	YTHS Y	72	GASSR A	96	YSSP V	120	6 ± 1	0.24 ± 0.02
YW107.4.41	WTHS Y	73	GASRL E	97	FISPH	121	5.5 ± 2.3	0.43 ± 0.07
YW107.4.76b	WVHS Y	74	GASSR A	98	YGTPI	122	3.9 ± 0.8	0.34 ±0.01

Tabla V. Análisis cinético de unión de IgGs anti-NRP1 a 25°C. Las afinidades de unión de IgGs anti-NRP1 se midieron en un instrumento BIAcore-3000 usando un chip de biosensor inmovilizado en IgG con diluciones de hNRP1 o mNRP1 que fluían a 25°C (Véase Materiales y Métodos). Cada medición tiene un error en K_d de aproximadamente $\pm 25\%$.

Clon	NRP1 murino			NRP1 humano		
	$k_{on}/10^5 (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}/10^{-4} (s^{-1})$	$K_d(nM)$	$k_{on}/10^5 (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}/10^{-4} (s^{-1})$	$K_d(nM)$
YW64.3	0.6	4.5	7.8	1.3	1.2	0.9
YW107.4	1.4	15	11	2.2	11	5
YW107.4.18	1.4	2.9	2.1	1.8	1.8	1
YW107.4.38	0.84	2.7	3.2	0.94	1.7	1.8
YW107.4.52	1.3	1.6	1.2	1.4	1.3	0.9
YW107.4.63	1.6	1.3	0.8	1.8	1.5	0.8
YW107.4.76	0.42	13	31	1.2	1.7	1.4
a						
YW107.4.87	1.6	2	1.3	1.9	0.77	0.4

Ejemplo 2. Actividades Biológicas de Anticuerpos Anti-NRP1

Las secuencias de anticuerpo de YW64.3 y YW107.4.87 se muestran en Figura 3. Para fines de esta solicitud en las siguientes descripciones de actividades de anticuerpos anti-NRP1, "YW64.3" y "anti-NRP^A" se usan indistintamente; y "YW107.4.87" y "anti-NRP^B" se usan indistintamente.

Materiales y Métodos

Cultivos de Células

HUVEC, HUAEC, y HMVECs se adquirieron de Cambrex y se cultivaron en medio EGM-2 (Cambrex). Las células y los cultivos de tejido se mantienen a 37°C en un incubador con 5% CO₂, 95% de humedad.

DRG y análisis de colapso del hipocampo

Análisis de colapso en axones de ratón E12.5 DRG se realizaron como se describe en He and Tessier-Lavigne (1997) *Cell* 90:739-751. En síntesis, explantes DRG se esparcieron en portaobjetos de 8 cámaras recubiertas con laminina (Nunc) y se cultivaron en medio N3-F12 con 50ng/ml NGF de un día para otro a 37°C en un incubador con 5% CO₂, 95% de humedad. Semaforina -3A humana (Met-1 a Val-771) se clonó en el vector de expresión eucariota pRK5 con una etiqueta de fusión de hexahistidina C-terminal. La proteína se expresó transitoriamente en células CHO y se purificó por cromatografía de afinidad NiNTA. Se utilizó secuenciamiento N-terminal para confirmar la proteína visible como una banda de 90 kDa en un gel SDS-PAGE coloreado con azul de Coomassie. Se agregó sema3A purificada a ~8ng/ml en la presencia o ausencia de inhibidores, y los explantes se incubaron a 37°C durante 30 minutos para inducir colapso. Para visualización, conos de crecimiento se fijaron en 4% PFA y 15% sacarosa, se colorearon con rodamina-faloidina (Molecular Probes) a 1:40 en PBS durante 30 minutos, y luego se lavaron y montaron con Fluoromount G (Fisher). Para realizar el análisis de colapso de hipocampo, cerebros de ratón E17 se diseccionaron en PBS enfriado y se seccionaron horizontalmente en rodajas de 250µm de espesor usando un tajador de tejido (McIlwain). El giro dentado se sub-diseccionó aún más de secciones seleccionadas del hipocampo usando finas agujas de tungsteno. Se esparcieron explantes en portaobjetos de 8 cámaras recubiertas con laminina (Nunc) y se cultivaron en medio neurobasal

87
46
90

suplementado con B27 (Gibco Life Technologies) de un día para otro a 37°C. Para inducir el colapso, los explantes se incubaron con control o anticuerpos anti-NRP1 (10 µg/ml) en la presencia de medio acondicionado con células COS transfectadas con control o transfectadas con Sema3F durante 30 minutos a 37°C.

Análisis de migración de células

Se realizaron análisis de migración de células usando un análisis de cámara Boyden modificada con el sistema insert 24-multiwell Falcon con tamaño de poro de 8µm (BD Biosciences). Las placas se recubrieron con 8 µg/ml de laminina (Invitrogen) durante 16 horas a 37°C en las dos cámaras superior e inferior. Se cosecharon HUVECs (80-90% confluencia) con tripsina, se contaron, se centrifugaron y se resuspendieron en EBM-2 con 0.1% BSA con una concentración de 5×10^5 células /ml. 100µl de células se agregaron a la cámara superior del sistema transwell. Se agregaron inhibidores a la cámara superior con las células inmediatamente antes de la adición de los estímulos a la cámara inferior (10ng/ml de VEGF en la mayoría de los casos), que contenían 500 µl EBM-2 con 0.1% BSA. Las placas se pusieron entonces a 37°C de un día para otro. Para cesar el análisis, se retiraron las células en la cara superior de la membrana usando un bastoncillo de esponja y las células en la cara inferior se fijaron con metanol y se colorearon con verde Cytox green (Molecular Probes). El número de células migradas en la cara inferior de la membrana se contaron usando un microscopio fluorescente AxiPhot y los resultados se analizaron con el programa ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Análisis de Excrecencia en Microesferas

Microesferas microcarrier Cytodex 3 recubiertas con dextrina (Amersham Pharmacia) se incubaron con HUVECs subconfluentes con una concentración de 400 células por microesfera en 1 ml de medio EGM-2, durante 4 horas a 37°C en un incubador 5% CO₂ con suave agitación cada 20 minutos. Las microesferas se transfirieron entonces a un frasco de cultivo de tejido 25-cm² (BD Biosciences) y se incubaron en 5 ml de EGM-2 durante 12-16 horas a 37°C. Microesferas recubiertas con HUVEC se lavaron entonces tres veces con 1ml EGM-2 y se resuspendieron en 2.5µg/ml de fibrinógeno (Sigma) en PBS con una densidad de 200 microesferas/ml. 0.5 ml de solución fibrinógeno/microesferas se transfirió en

88
91

un pocillo de una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos que contenía 0.625 unidades de trombina (Sigma) para inducir coagulación. La solución fibrinógeno/microesferas se incubó durante 5 minutos a temperatura de la sala, luego durante 20 minutos a 37°C en un incubador 5% CO₂. Una vez completa la coagulación, se agregó 1ml de EGM-2 a cada pocillo y el coágulo se equilibró durante 30 minutos a 37°C. Se retiró el medio, y 1ml de células fibroblastos de la piel (Detroit 551) con una concentración de 2000/ml en medio EGM-2 se esparcieron en la parte superior del coágulo. A continuación se agregaron diferentes anticuerpos a cada pocillo y el análisis se monitoreó durante 8 días con cambio en el medio cada 2-3 días. Se tomaron imágenes de resolución 10x de las microesferas con un microscopio invertido, y círculos concéntricos espaciados a 100, 200, y 300 µm se trazaron digitalmente alrededor de la microesfera en cada imagen. Se contó el número de vasos que cruzaban cada línea y se tomó el promedio en cada distancia y condición.

Análisis FACS

HUVECs confluentes se incubaron con control o anticuerpos anti-NRP1 con 10µg/ml durante 5 minutos, 2 horas o 20 horas a 37°C en un incubador 5% CO₂. Las células se cosecharon con solución amortiguadora de disociación de células libre de enzima (Gibco), neutralizada con un volumen igual de solución amortiguadora FACS (1 x PBS, 2% FBS, 2 mM EDTA, 0.1% azida de sodio) y se transfirieron en placas de análisis de 96 pocillos con fondo en U Pro-bind (Falcon) con 500.000 células por pocillo. Se recogieron los sedimentos celulares mediante centrifugación a 2k rpm, y se resuspendieron en 25 µl de solución amortiguadora colorante (solución amortiguadora FACS con 5% suero de ratón normal, 2% de suero de rata normal y 10% 10 µg/ml IgG humana) que contenía anticuerpo biotinilado apropiado a 1:100, seguido por una incubación de 2 horas a 4°C. Los anticuerpos se biotinilaron usando el kit FluoReporter mini-biotin-xx protein labeling (Molecular Probes). A continuación las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS, y se incubaron en 25µl de solución amortiguadora FACS que contenía 1:1000 estreptavidina-PE (BD Biosciences) durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, las células se lavaron y se resuspendieron en solución amortiguadora FACS, y se analizaron con el sistema FacsCalibur (BD Biosciences).

Análisis de Adhesión Celular

HUVECs subconfluentes se pre-incubaron en 100µl de medio 199 con control o anticuerpo anti-NRP1 durante 30 minutos a 37°C, luego se esparcieron en placas de 96 pocillos de fondo plano NUNC maxisorp (eBioscience) recubiertas con 1µg/ml fibronectina (Roche) con 10.000 células por pocillo. Las placas se centrifugaron durante 1 minuto a 140 g para sincronizar el contacto de las células con el sustrato, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. A continuación las placas se lavaron 3 veces con PBS, se congelaron a -80°C durante dos horas. Se determinó la densidad celular con el kit CyQuant (Molecular Probes).

Análisis vascular retiniano neonatal de ratón

A ratones CD1 neonatales (las mismas camadas) se administraron por vía i.p. diferentes anticuerpos con una concentración de 10 mg/kg. Las inyecciones se realizaron en día postnatal 1 y 3 durante los estudios del día postnatal 5 (P5), y el día 1, 3 y 5 durante los estudios P8. Se recogieron los ojos y se fijaron con 4% PFA en PBS durante 16 horas a 4°C, seguidos por lavados PBS. Las retinas diseccionadas se bloquearon con 10% de suero de ratón en PBSt (PBS, 1% Triton X-100) durante 3 horas, luego se incubaron de un día para otro a 4°C con isolectina biotinilada B4 (*Bandeiraea simplicifolia*; Sigma) 25µg/ml en PBLEC (1% Triton X-100, 0.1mM CaCl₂, 0.1mM MgCl₂, 0.1 mM MnCl₂, en PBS pH 6.8). Luego se lavaron las retinas 4 veces en PBSt, y se incubaron con estreptavidina Alexa 488 (1:200; Molecular Probes) de un día para otro a 4°C. Una vez concluida la coloración, las retinas se lavaron 4 veces en PBSt, posteriormente se fijaron con 4% PFA en PBS, seguidos por otros 4 lavados en PBS. Se tomaron imágenes de retinas montadas planas mediante microscopía de fluorescencia confocal.

Análisis de permeabilidad vascular de piel de ratón

Ratones hembra C57BL6J de 5-7 semanas de nacidos se inyectaron con 150µl 0.5% de solución azul de Evan por vía i.v. Las áreas de la espalda y los costados de los animales se rasuraron para retirar el pelo debajo del cuello y encima de la cadera, y el área rasurada se dividió en 4 zonas de inyección. Una hora después de la inyección de azul Evan, se inyectaron 20µl de PBS que contenía BSA (7.5 µg/ml) o hVEGF (7.5 µg/ml) con o sin anticuerpo (0.5 mg/ml) se

inyectaron por vía i.d. aleatoriamente en una cualquiera de las cuatro zonas, una inyección en cada zona. Una hora después de la inyección i.d., los animales se sacrificaron y se diseccionó la piel que contenía las 4 zonas. Se tomó una imagen digital de la piel. Se usó un punzón de biopsia de 8mm para cortar muestras de piel de la misma área en los sitios de inyección, y las muestras de piel se incubaron en solución de formamida a 55°C durante 48 horas para extraer el colorante azul de Evan de los tejidos. Luego se midió la absorbencia de la solución con un espectrómetro a 605nm.

Análisis de proliferación celular

Se analizó la proliferación celular con el kit Cell Proliferation ELISA (Roche). En pocas palabras, se cosecharon HUVECs con una confluencia del 90% y se resuspendieron en medio de análisis (DMEM:F1250:50, 1.5% FBS), y se esparcieron a 3.000 células por pocillo en placas negras de cultivo de tejido con 96 pocillos (ViewPlate-96, Perkin Elmer) pre-recubiertas con 1% gelatina. Las células se incubaron a 37°C durante 16 horas, se cambiaron a medio de cultivo fresco y se incubaron durante otras 8 horas. Se agregaron VEGF (20 ng/ml) y diferentes anticuerpos al cultivo y las células se incubaron durante 20 horas. Se agregó solución de marcaje BrdU a una concentración final de 10 mM y a 37°C. La incorporación BrdU se determinó mediante inmunoanálisis de quimioluminiscencia.

Análisis de fosforilación VEGFR2

VEGFR2 total y phospho-VEGFR2 se determinaron con kits DuoSet IC ELISA kits (R&D). En síntesis, HUVECs subconfluentes se enjuagaron con PBS y se disolvieron en la solución amortiguadora de lisis provista. Los lisados celulares se centrifugaron a 14 kg durante 5 minutos a 4°C, y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. Luego se llevaron a cabo análisis ELISA, según las instrucciones.

Immunoblotting

HUVECs confluentes se sometieron a inanición durante 16 horas en EBM-2 con 0.2% FBS y 0.1% BSA, y luego se cambiaron a EMB-2 con 0.1 % BSA, seguido por una incubación de 90 minutos a 37°C. Se agregaron anticuerpos de

9K
100
94

control y anticuerpos anti-NRP1 a 50µg/ml, y las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las células se estimularon con VEGF (20 ng/ml) durante 10 minutos a 37°C, se lavaron dos veces con PBS helado y se desintegraron en solución amortiguadora de lisis que contenía 20 mM Tris 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, mezcla I y II de inhibidor de fosfatasa (Sigma) y una tableta completa de inhibidor de proteasa (Roche). Alícuotas de lisado se sometieron a electroforesis en 4-20% geles Novex Tris-Glycine SDS (Invitrogen), seguida por electrotransferencia a una membrana Invitrolon PVDF (Invitrogen). Los anticuerpos primarios usados en este estudio fueron anti-Erk, anti-phospho-Erk, anti-Akt, anti-phospho-Akt, anti-p38, anti-phospho-p38, anti-Src y anti-phospho-Src (Tyr416), todos adquiridos de Cell Signaling Technology.

Resultados

A. Acciones selectivas de anti-NRP1^A y anti-NRP1^B sobre la función Sema3A y la unión VEGF, respectivamente

Anticuerpos Anti-NRP1 se estudiaron en cuanto a su capacidad de bloquear la unión de VEGF₁₆₅ a NRP1. Anti-NRP1^B bloqueó vigorosamente la unión VEGF a NRP1, mientras que anti-NRP1^A no (Figura 4). Estos resultados sugieren que los dominios CUB (a1-a2) de NRP1 no son necesarios para la unión VEGF. Gu et al. (2002) *J Biol Chem* 277: 18069-18076.

A continuación, se estudiaron anticuerpos anti-NRP1 en cuanto a sus efectos sobre la función Sema3A. Previamente se ha sugerido que Sema3A y VEGF₁₆₅ pueden compartir dominios de unión con superposición en la región N-terminal del dominio b1 y competir, en consecuencia, por unión a NRP1. Gu et al. (2002) *J Biol Chem* 277:18069-18076; Miao et al. (1999) *J Cell Biol* 146:233-242. Por lo tanto, parecía posible que un solo anti-NRP1 mAb bloqueara la unión Sema3A y VEGF. El anti-NRP1 mAbs de esta invención se estudiaron en cuanto a sus capacidades de bloquear el colapso de los conos por crecimiento de axones inducido por Sema3A. Ganglios de la raíz dorsal (DRG) se diseccionaron de embriones de ratón E12.5 y se cultivaron para establecer conos de crecimiento de neuronas sensoras que eran sensibles al colapso dependiente de Sema3A/NRP1. He and Tessier-Lavigne (1997) *Cell* 90:739-751. Agregar Sema3A a estos cultivos causó que los conos de crecimiento retrayeran sus estructuras ricas en actina. Sin

92
104
95

embargo, si se agregaba anti-NRP1^A a los pocillos al mismo tiempo que Sema3A, el colapso se bloqueó completamente. En contraste, anti-NRP1^B no tuvo efecto sobre el colapso inducido por Sema3A (Figura 5A).

Estos dos anticuerpos tienen por lo tanto acciones funcionalmente distintas: anti-NRP1^A bloque la función Sema3A pero no interfiere la unión VEGF a NRP1; mientras que anti-NRP1^B bloque la unión VEGF a NRP1 sin efecto sobre la función Sema3A. Estudios adicionales demostraron que ninguno de los dos anticuerpos bloquea el colapso dependiente de Sema3F/NRP2 de los conos de crecimiento de hipocampo E17 (Figura 5B), consistente con la observación de que ninguno de los dos anticuerpos une NRP2. En consecuencia los anticuerpos aportan herramientas selectivas para analizar por separado el papel de NRP1 en biología vascular, y medios para bloquear selectivamente las actividades NRP1.

B. Ambos anti-NRP1^A y anti-NRP1^B reducen la migración celular endotelial independiente de VEGF y la excrecencia en microesferas

Los anti-NRP1 mAbs de la invención se estudiaron en migración de células endoteliales (EC) activada por VEGF. Usando un sistema transwell, se introdujeron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs) en la cámara superior, mientras que VEGF se agregó a la cámara inferior para promover la migración EC. A continuación, ECs que habían migrado a la cámara inferior, se fijaron, colorearon y cuantificaron (Figura 6A). Se usaron anticuerpos anti-VEGF como control positivo para bloquear la migración EC activada por VEGF en este y en experimentos subsiguientes (un anticuerpo anti-VEGF reactivo de especie cruzada, B20.4.1, se utilizó en todos los experimentos, a menos que se indique lo contrario; Liang et al. (2006) *J Biol Chem* 281:951-961).

Anti-NRP1 mAbs se agregaron a las células en la cámara superior justo antes de la adición de VEGF. Es interesante que los dos anti-NRP1^A y anti-NRP1^B redujeron significativamente la migración de células endoteliales, proporcionando anti-NRP1^B un bloqueo más fuerte de la migración (Figura 6A). Resultados similares se obtuvieron usando otros dos tipos de líneas EC, HUAECs y HAECs.

Para examinar más detenidamente el papel de NRP1 y anti-NRP1 mAbs en funciones EC más complejas, se empleó un sistema *in vitro* de formación de

97
102
96

brotos angiogénicos. Nakatsu et al. (2003) *Microvasc Res* 66:102-112. En este análisis, ECs recubiertas en microesferas brotaron durante un período de siete días, resultando en múltiples estructuras de vasos bien definidos que sobresalían de cada microesfera. La adición de anti-NRP1 mAbs a estos cultivos resultó en la reducción de la longitud de los vasos y, en el caso de anti-NRP1^B, se observó igualmente una disminución en el número de brotes. Esta observación fue confirmada mediante cuantificación (Figura 6B). Se utilizó anti-VEGF como control positivo y bloqueó completamente la formación de brotes en este análisis. Los resultados confirmaron los fuertes efectos para cada anti-NRP1 mAb en reducir la migración EC y la excrecencia de vasos en este análisis *in vitro*.

C. NRP1 es necesario para la remodelación vascular en la retina de ratón

Fenotipos observados en los ratones con *Nrp1* inactivado son consistentes con un defecto en la remodelación vascular. Gu et al. (2003) *Dev Cell* 5:45-57; Kawasaki et al. (1999) *Development* 126:895-4902; Takashima et al. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3657-3662. Seguidamente se examinó el papel de NRP1 en la remodelación vascular analizando los efectos del tratamiento sistémico con los anti-NRP1 mAbs sobre el desarrollo de la retina de ratón, el cual es un modelo ideal para investigar los eventos estereotipados de la formación de brotes vasculares, remodelación y maduración. Dorrell and Friedlander (2006) *Prog Retin Eye Res* 25:277-95. Al momento del nacimiento, existe una red astrocítica para guiar la formación de brotes EC desde la arteria retiniana central, localizada cerca de la cabeza del nervio óptico (ONH). Después de un día de vida postnatal (P1) la vasculatura retiniana ha desarrollado un surco morfogénico en la capa fibrosa del nervio (NFL), situada superficial a la capa ganglionar, que comienza a expandirse hacia el borde de la retina en un patrón concéntrico, llegando al punto medio en P5 (Figura 7A). Durante los siguientes tres días el surco continúa extendiéndose al borde de la retina, mientras que el plexo vascular más próximo al ONH experimenta un remodelamiento estereotipado, conformado por adelgazamiento del plexo vascular en una red capilar refinada en la NFL (Figura 7B), y la formación de brotes de vasos en capas más profundas de la retina (Figura 7C).

Se inyectaron anticuerpos a ratones neonatales comenzando en P1, seguidos por inyecciones cada dos días hasta la recolección de las retinas en P5 y

94
103
92

P8. Para visualizar la vasculatura, las retinas se colorearon con isolectina B4 y se compararon. Aunque la red capilar refinada del grupo de control IgG está bien establecida entre P5 y P8, este remodelamiento vascular se inhibe completamente por los dos anti-NRP1 mAbs. Se cuantificó esta diferencia comparando la densidad vascular de imágenes representativas tomadas de la red vascular NFL en regiones adyacentes al ONH (Figura 7D). Debido a que el tratamiento con uno cualquiera de los dos anti-NRP1 mAb resulta en una fuerte inhibición de remodelamiento vascular, la densidad vascular es significativamente más alta en las dos retinas tratadas con anti-NRP1^A y anti-NRP1^B, comparadas con los controles. Curiosamente, el surco en desarrollo continúa extendiéndose en las dos retinas tratadas con anti-NRP1 mAb, con sólo una ligera inhibición de la extensión en los animales tratados con anti-NRP1^B (Figura 7E). Esto sugiere que, en general, no se inhibe el desarrollo de la retina, pero que, en su lugar, hay un bloqueo específico en la remodelación vascular cuando se trata con uno cualquiera de los dos anti-NRP1 mAb.

En contraste con los anti-NRP1 mAbs, el tratamiento anti-VEGF resultó en una reducción de la densidad vascular retiniana, comparada con el control (Figura 7D). En un nivel cualitativo, los vasos en retinas tratadas con anti-VEGF tienen una menor complejidad en P8, una tendencia que está presente pero menos obvia en P5. Estos datos sugieren que el tratamiento con anti-VEGF resulta en bloqueo de la formación inicial de brotes y/o regresión vascular. Curiosamente, la aplicación sistémica de anti-VEGF no reduce significativamente la extensión del surco vascular (Figura 7E). Esto es probablemente una consecuencia de una baja difusión del anticuerpo a las células del ápice en extensión debido a la falta de luces vasculares en esta región externa. Gerhardt et al. (2003) *J Cell Biol* 161:1163-1177.

La evaluación de retinas P8 permitió igualmente la investigación posterior de los efectos del tratamiento con anticuerpo sobre la formación de brotes angiogénicos. Entre P5 y P8, los vasos empiezan a brotar de la red vascular NFL en capas vasculares más profundas resultando en la formación de la red vascular de la capa plexiforme exterior (OPL), que es superficial a la capa nuclear exterior y es el lecho vascular más profundo en la retina (Figura 7C). Más tarde en el desarrollo, la formación de brotes de colaterales que dieron lugar a la OPL resulta en un lecho vascular intermedio, denominado la capa plexiforme interna (IPL).

85
164
98

Imágenes de la OPL en P8 muestran una completa inhibición de la formación de brotes por ambos tratamientos con anti-NRP1 mAbs y con anti-VEGF.

Los diferentes fenotipos observados en retinas tomadas de animales tratados sistemáticamente con uno cualquiera de anti-NRP1^A o anti-NRP1^B, comparados con anti-VEGF, sugieren que NRP1 puede regular la función EC por mecanismos distintos de aumentar la señalización VEGFR2.

D. El Bloqueo de la función NRP1 tiene poco efecto sobre la señalización VEGFR2

Habiendo observado que NRP1 se necesita para la migración de células endoteliales en respuesta a VEGF, investigamos el requerimiento de NRP1 en la proliferación EC y la permeabilidad vascular — dos actividades celulares definitorias inducidas por VEGF. Notablemente, el tratamiento con cualquiera de los anti-NRP1^A o anti-NRP1^B no tuvo efecto sobre la permeabilidad inducida por VEGF, mientras que anti-VEGF proporcionó un fuerte bloqueo (Figura 8A). Una tendencia similar se observó al examinar la proliferación EC inducida por VEGF, no mostrando el anti-NRP1^A bloqueo de la proliferación, y el anti-NRP1^B únicamente una ligera reducción de respuesta a la dosis (Figura 8B). Estos resultados respaldan datos publicados previamente que muestran que la inactivación del ARNip de NRP1 en ECs no afecta la proliferación inducida por VEGF (Murga et al. (2005) *Blood* 105:1992-1999), y sugiere que el papel primario de NRP1 en los comportamientos EC activados por VEGF es mediar la migración de las células.

Se estudió el efecto de anticuerpos anti-NRP1 sobre la señalización VEGFR2. VEGF se une a los dominios IgG extracelulares segundo y tercero de VEGFR2, y activa el receptor desencadenando la auto-fosforilación de varios residuos de tirosina en el dominio intracelular. En contraste con el anti-VEGF, que bloqueó completamente la fosforilación VEGFR2 inducida por VEGF en HUVECs, el anti-NRP1^A no cambió significativamente los niveles de fosforilación VEGFR2, mientras que el anti-NRP1^B resultó únicamente en una modesta reducción (Figura 8C).

96
95
99

Más que regular el nivel de fosforilación VEGFR2 directamente, NRP1 puede actuar para modular vías VEGFR2 específicas. Para abordar esta posibilidad, se examinó el efecto del tratamiento con anti-NRP1 sobre los episodios de señalización corriente abajo mediados por VEGFR2. Se ha demostrado que VEGFR2 induce la proliferación EC mediante la activación de proteína cinasas activadas por mitógeno Erk1/2 (Rousseau et al. (1997) *Oncogene* 15:2169-2177; Takahashi et al. Shibuya (1999) *Oncogene* 18:2221-2230), y regula la supervivencia EC y la permeabilidad vascular a través de la vía PI3-cinasa/Akt. Chen et al. (2005) *Nat Med* 11:1188-1196; Gerber et al. (1998) *J Biol Chem* 273:13313-13316; Six et al. (2002) *FEBS Lett* 532:67- 69. Consistente con la observación de que tratamientos con anti-NRP1 mAb no cambiaron significativamente la proliferación EC inducida por VEGF o la permeabilidad vascular, la incubación anti-NRP1^A y anti-NRP1^B no afectó la fosforilación inducida por VEGF de Erk1/2 o Akt. De otro lado, la inhibición de la función NRP1 con anticuerpos anti-NRP1 redujo fuertemente la migración EC. Es posible que NRP1 regule específicamente las vías VEGFR2 requeridas para la motilidad celular, tales como la vía cinasa p38 MAP, que se ha comprobado que se requiere para la reorganización de actina activada por VEGF y la migración celular en ECs. Rousseau et al. (1997) *Oncogene* 15:2169-2177. Los tratamientos con anti-NRP1^A y anti-NRP1^B llevaron ambos a una ligera reducción en el nivel de fosforilación p38 en HUVECs (Figura 8D), prestándole apoyo a esta hipótesis. No obstante, es poco probable que la moderada disminución en la fosforilación p38 sola justifique la fuerte reducción que observamos en los análisis de migración y formación de brotes, como se describe en las secciones anteriores (Figura 6), o explique los fenotipos cualitativamente diferentes observados en los tratamientos con anti-NRP1 mAbs y anti-VEGF mAb en los experimentos de remodelamiento vascular retiniano (Figura 7).

Ejemplo 3. Actividades Inhibitorias de Tumor de los Anticuerpos Anti-NRP1

Materiales y Métodos

Las líneas celulares humanas, carcinomas pulmonares amicrocíticos H1299 y SK-MES-1 se obtuvieron de ATCC (Rockville, MD). Para SK-MES-1, cada ratón hembra atímico HRLN recibió s.c. un implante de fragmento de tumor de 1mm³ en el costado. Para H1299, se inyectaron s.c. 1x10⁷ células de tumor en el costado de ratones atímicos hembra HRLN. Se monitoreó el crecimiento del tumor dos

97
106
100

veces a la semana con mediciones del calibre. Cuando los tumores alcanzan un tamaño medio de 80-120 mm³, los ratones se clasificaron para obtener tamaños medios de tumores casi idénticos, y se inició el tratamiento. Éste se consideró el día 1 de cada estudio. Todos los tratamientos se ajustaron por peso corporal a 0.2 ml/20 g. Volumen del tumor (mm³) = ancho² x longitud / 2. Inhibición porcentual del tamaño del tumor (%TGI) = (volumen promedio del tumor de la rama de control — volumen mediano del tumor de la rama de control / volumen mediano del tumor de la rama de control) x 100. %TGI se mide únicamente mientras todos los animales permanecen en el estudio (para SK-MES-1 = día 22; para H1299 = día 15). Tiempo al criterio de valoración (TTE) = log₁₀ (volumen del criterio de valoración, mm³) - b / m; donde **b** es la intersección y **m** es la pendiente de la línea obtenida mediante regresión lineal de los datos de crecimiento del tumor logarítmicamente transformados. El retraso del crecimiento porcentual del tumor (%TGD) = (TTE mediano para una rama de tratamiento - TTE mediano para la rama de control / TTE mediano para la rama de control) x 100.

Los ratones se anestesiaron con avertina (1.3% tribromoetanol y 0.8% alcohol amílico; Sigma-Aldrich). Lectina de *Lycopersicon esculentum* marcada con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (150 µg en 150 µl de 0.9% NaCl; Vector Laboratories) se inyectó i.v. 3 minutos antes de la perfusión sistémica. Se perfundió la vasculatura transcárdialmente con 4% paraformaldehído (PFA) en PBS durante 2 a 3 minutos. Se extirparon los tumores y se pos-fijaron por inmersión en el mismo fijador durante 16 horas, seguida por una incubación en sacarosa al 30% de un día para otro para crioprotección, luego se implantaron en OCT y se congelaron. Se cortaron secciones (30µm) y se montaron en porta-objetos de vidrio, se rehidrataron y se bloquearon en PBSt (PBS, 0.5% Triton X-100) con 5% suero normal de cabra durante 2 horas a temperatura de la sala. Las secciones se incubaron de un día para otro con anti-NRP1^B (1:500) o PDGFRβ anti-ratón en rata (1:1000; clon APB5, eBioscience) a 4°C. A continuación las secciones se lavaron 4 veces en PBSt, y se incubaron con anticuerpos secundarios, IgG anti-humana en cabra Alexa 488 e IgG anti-rata en cabra Alexa 568 (1:200; Molecular Probes), durante 4 horas a temperatura de la sala. Una vez concluida la coloración, las secciones se lavaron 4 veces en PBSt, se pos-fijaron con 4% PFA en PBS, seguidos por otro 4 lavados en PBS. Se retiró la solución final de lavado, y se agregaron 1-2 de Fluoromount-G (SouthernBiotech). Se

pusieron cubiertas de vidrio sobre las muestras, y se tomaron imágenes con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot.

Resultados

Se ha demostrado que el bloqueo de la vía VEGF reduce la neovascularización en modelos de tumor en ratones y en neoplasias malignas humanas. Ferrara and Kerbel (2005) *Nature* 438:967-974. No obstante, se cree que algunos tumores son menos dependientes de VEGF para la formación de vasos, o pueden volverse insensibles a terapias con anti-VEGF. Jain et al. (2006) *Nat Clin Pract Oncol* 3:24-40; Kerbel et al. (2001) *Cancer Metastasis Rev* 20:79-86. Para determinar si el bloqueo NRP1 podía aumentar la inhibición del crecimiento del tumor proporcionada bloqueando VEGF, seleccionamos varios modelos de xenoinjerto conocidos por exhibir una sensibilidad variable a la terapia con anti-VEGF. Puesto que se ha demostrado que el VEGF estromal de ratón, además del VEGF derivado de tumor, impacta el crecimiento del tumor, utilizamos anti-VEGF mAbs que reconocen VEGF tanto humano como murino. Liang et al. (2006) *J Biol Chem* 281:951-961.

Estos experimentos se diseñaron para estudiar el efecto de bloquear NRP1 solo y en combinación con anti-VEGF. También se incluyeron anti-VEGF como agente único y anticuerpo de control isotipo. SK-MES-1 es un modelo de xenoinjerto NSCLC que expresa NRP1 principalmente en tejido vascular y estromal, con un nivel intermedio de expresión en células tumorales. En este modelo, anti-VEGF proporcionó una inhibición del 52% de inhibición del crecimiento del tumor (TGI), anti-NRP1^B como agente único causó una TGI del 37%, y anti-NRP1^A no tuvo un efecto significativo sobre TGI (Figura 9A).

Sorprendentemente, el efecto aditivo se observó cuando cualquiera de los dos anticuerpos anti-NRP1 se utilizó en combinación con anti-VEGF. Como se muestra en Figura 10A, anti-NRP1^A usado en combinación con anti-VEGF aumentó la TGI desde alrededor de 52% a alrededor de 70%; y anti-NRP1^B usado en combinación con anti-VEGF aumentó la TGI a alrededor de 77% (Figura 9A). Resultados similares se obtuvieron en el modelo de xenoinjerto H1299 NSCLC, que expresa igualmente NRP1 en tejidos vasculares y estromal con altos niveles, pero en células tumorales en una extensión menor. anti-NRP1^B como agente

99
101
102

único mostró 39% TGI, anti-VEGF mostró 28% TGI, y la combinación mostró 51% TGI (Figura 9C).

Animales en el modelo SK-MES-1 se medicaron el día 35 y se siguieron el día 60 para examinar el retraso en el crecimiento del tumor (los animales se retiraron del estudio cuando los tamaños del tumor excedieron los 1500 mm³; no se retiraron animales como resultado de la toxicidad). El gráfico Kaplan-Meier muestra un efecto significativo de las dos ramas de combinación anti-NRP1 mAb en retrasar el crecimiento del tumor, comparadas con las ramas de agente único (Figura 9B). Las mediciones del retraso del crecimiento del tumor (TGD) no muestran retraso del agente único para anti-NRP1^A; 24% TGD para anti-NRP1^B; 60% TGD para anti-VEGF; 93% TGD para la rama de combinación anti-NRP1^A + anti-VEGF; y 96% para la rama de combinación anti-NRP1^B + anti-VEGF.

Resultados similares a los vistos en los modelos NSCLC se observaron también en un modelo murino de cáncer de mama, denominado founder 5 (Fo5), en el cual tumores generados por la expresión transgénica MMTV-Her2 se diseccionaron y se implantaron en ratones atímicos. Finkle et al. (2004) *Clin Cancer Res* 10:2499-2511. En este modelo, NRP1 se expresa principalmente en vasos y estromas adyacentes, y el anti-VEGF es de nuevo sólo parcialmente efectivo en reducir el crecimiento del tumor (Figura 9C). La inhibición del crecimiento fue similar a la observada en los modelos NSCLC; no obstante, para enfocarse en los cambios histológicos en el contexto del tratamiento con anti-NRP1 y anti-VEGF, los animales se recogieron el mismo día al comienzo del experimento (línea con marcas entrecortadas; Figura 9C).

Utilizando el modelo Fo5 para estudios de histología vascular, observamos que los tumores de control mostraron vasos desorganizados muy grandes, que por lo general carecen de cobertura de pericitos, tal como se determinó mediante inmunohistoquímica PDGFR- β . El tratamiento con anti-VEGF solo resultó en una disminución en el diámetro de los vasos y una reducción general en la densidad vascular. Adicionalmente, la mayoría sino la totalidad de los vasos que permanecieron en los tumores tratados con anti-VEGF mostraron una estrecha asociación de pericitos. Resultados similares se observaron con otros marcadores de pericitos.

100
109
103

Vasos de tumores tratados con cualquiera de los dos anti-NRP1 mAb solos parecen similares en morfología a vasos tratados con anti-NRP1 en retinas de ratón neonatal, con vasos que aparecían planos y desorganizados, manteniendo una apariencia tipo plexo. Por otro lado, similares a los vasos del tumor tratados con control, los tumores tratados con cualquiera de los dos anti-NRP1 mAb carecen también de cobertura significativa de pericitos. Muy curiosamente, los tumores que se trataron con anti-VEGF y cualquiera de los dos anti-NRP1^A o anti-NRP1^B, mostraron un fenotipo combinado, con reducción de los vasos similar a los tumores tratados con anti-VEGF, pero con vasos restantes que parecían menos refinados y que carecían de una asociación estrecha de pericitos.

Estas observaciones morfológicas se correlacionan con los cambios cuantificados en la densidad vascular. Como se muestra en Figura 10, el tratamiento con los dos anticuerpos anti-NRP1 y anti-VEGF disminuyó la densidad vascular (10A). De otra parte, únicamente anti-VEGF parece aumentar la coloración de pericitos en las muestras de tumores examinadas, comparadas con el control. En general, la relación pericitos/vascular, que mide la cobertura de pericitos relativa, muestra que los tumores tratados con anti-VEGF tenían la relación más alta, que se disminuye mediante el tratamiento con anti-NRP1^A y anti-NRP1^B.

Los descubrimientos de que anti-NRP1 (anti-NRP1^A y anti-NRP1^B) y anti-VEGF pueden actuar bloqueando diferentes funciones EC y/o vías de señalización plantearon la posibilidad de que la combinación de estos anticuerpos en modelos de tumor podría tener un efecto sinérgico o aditivo en reducir el crecimiento del tumor. Por supuesto, se observó un profundo efecto aditivo al combinar anti-NRP1 con anti-VEGF (Figura 9). Especialmente en el caso de anti-NRP1^A, los resultados sugieren un efecto sinérgico, más que aditivo, puesto que en múltiples modelos de tumor el volumen medio del tumor luego del tratamiento con anti-NRP1^A como agente único no fue diferente del control, pero el anticuerpo aumentó significativamente la respuesta del tumor cuando se combinó con anti-VEGF, comparado con el tratamiento de anti-VEGF solo.

En el caso de anti-NRP1^B, el tratamiento con un agente único resultó en una reducción significativa en el crecimiento del tumor. Es interesante ver que, estos efectos son tan sólo ligeramente menos potentes que el anti-VEGF solo. No

obstante, la reducción en el crecimiento del tumor de las ramas de combinación para anti-NRP1^B fue similar a las ramas de combinación anti-NRP1^A. El efecto de agente único de anti-NRP1^B puede deberse a su actividad inhibitoria relativamente más fuerte en reducir la formación de brotes y la angiogénesis *in vivo*, comparada con anti-NRP1^A. Por otro lado, ambos anticuerpos fueron igualmente potentes en bloquear la remodelación vascular en el análisis de desarrollo retiniano en ratón e inhibir la asociación de pericitos con vasos en el modelo de tumor Fo5.

Se ha propuesto que la remodelación vascular en la retina tiene lugar en la ausencia de estrechas asociaciones de pericitos, sugiriendo que los pericitos sirven para estabilizar los vasos sanguíneos inmaduros que concluyen el período de plasticidad de la remodelación de los vasos. Benjamin et al. (1998) *Development* 125: 1591-1598. Los descubrimientos de esta invención sugieren que NRP1 se requiere para este intrincado proceso de remodelamiento de vasos, que consiste en la morfogénesis del plexo vascular en capilares finos, seguida por la maduración posterior.

La idea de los pericitos que estabilizan los vasos del tumor, dando así origen a resistencia a la terapia con anti-VEGF como consecuencia de que los vasos pierdan su dependencia de VEGF, se ha propuesto y examinado experimentalmente. Bergers et al. (2003) *J Clin Invest* 111:1287-1295; Erber et al. (2004) *Faseb J* 18:338-340. En estos estudios, se observó que el bloqueo tanto de la función de VEGF (ligando EC) como de PDGF (ligando de pericito) resulta en el rompimiento posterior de la vasculatura del tumor. Posteriormente, se ha demostrado en estudios radiográficos que bloquear la función VEGF sola en tumores resulta en una cantidad significativa de la regresión vascular, pero los vasos restantes se "normalizan" con estrechas asociaciones de pericitos, posiblemente como consecuencia de vasos inmaduros que experimentan remodelamiento vascular y maduración. Inai et al. (2004) *Am J Pathol* 165:35- 52.

Basados en las observaciones obtenidas en la retina en desarrollo, puede postularse que bloquear la función NRP1 en tumores reducirá igualmente la remodelación vascular de los vasos del tumor, inhibiendo posteriormente la maduración de los vasos, manteniendo por lo tanto a los vasos en un estado de dependencia del VEGF. Esto solo puede no tener un efecto significativo en reducir el crecimiento del tumor, ya que la mayoría de los vasos del tumor ya están

102
111
105

inherentemente desorganizados. Baluk et al. (2005) *Curr Opin Genet Dev* 15:102-111. Esta predicción es consistente con la observación que, aunque el anti-NRP1^A inhibe fuertemente la remodelación vascular, no observamos un efecto de agente único con este anticuerpo en reducir el crecimiento del tumor. No obstante, se especuló que bloquear la remodelación vascular, y la subsiguiente maduración, en combinación con una terapia anti-VEGF puede hacer los vasos restantes del tumor más susceptibles a regresión. Los experimentos de la presente invención mostraron que los vasos restantes en los tumores tratados con cualquiera de los dos anti-NRP1 mAb en combinación con anti-VEGF carecen por supuesto de asociación de pericitos. Estos resultados sugieren que el efecto aditivo que observamos en bloquear la función NRP1 y VEGF puede surgir como una consecuencia de hacer los vasos restantes en tumores tratados con anti-VEGF más vulnerables a regresión.

Basados en los resultados obtenidos en la retina en desarrollo y en modelos de tumor de xenoinjerto, se postula que bloquear la función NRP1 en vasos recién formados impide que los vasos experimenten remodelación y maduración subsiguiente, haciendo así estos vasos más dependientes de VEGF para su supervivencia (véase el modelo en Figura 11A). Consistente con este modelo, observamos una disminución significativa en la densidad vascular de la retina en desarrollo en ratones neonatos tratados con ambos anti-NRP1^B y anti-VEGF con la mitad de la dosis de agente único solo (dosis única = 10mg/kg, dosis de combinación = 5mg/kg de cada anticuerpo). Véase Figura 11B, comparada con Figura 7D.

Más aún, es posible que NRP1 pueda requerirse asimismo no sólo para la función endotelial sino también para la función pericítica. Recientemente se ha informado que bFGF induce la regulación por aumento de NRP1 en células del músculo liso, resultando en la capacidad de VEGF de inducir la migración de células del músculo liso. Liu et al. (2005) *Cytokine* 32:206-212. En el presente experimento, la expresión de NRP1 se observó en células humanas del músculo liso, así como en pericitos en varios tumores humanos y murinos (por ejemplo, la expresión de NRP1 se extiende a áreas adyacentes a la tinción positiva en lectina en el modelo Fo5).

109
HT2
100

En conclusión, los experimentos descritos en esta solicitud demuestran que bloquear la función NRP1 y VEGF en modelos de tumor resulta en un efecto aditivo en reducir el crecimiento del tumor. Se presentan igualmente evidencias de que NRP1 puede actuar también a través de mecanismos distintos de la señalización VEGFR2.

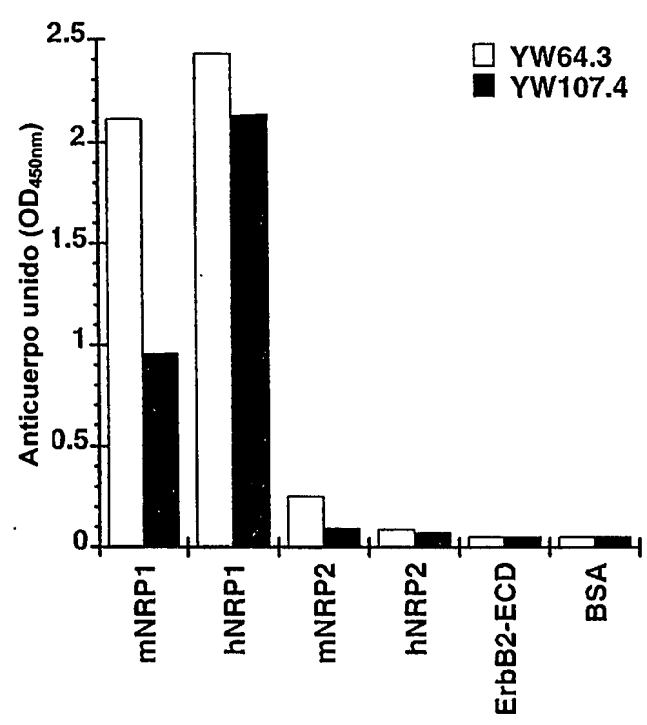
104
107
113

REIVINDICACIONES DIVISIONAL

1. Un anticuerpo anti-neuropilina-1 (NRP1) que se une a NRP1, el cual comprende un dominio variable de cadena ligera que consta de una CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129, una CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:130 y una CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:131, y el cual consta de un dominio variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132, una CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:133 y una CRDH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:134.
2. El anticuerpo anti-NRP1 de acuerdo con la reivindicación 1, que consta de un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.
3. El anticuerpo anti-NRP1 de acuerdo con la reivindicación 1, que consta de un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6.
4. El anticuerpo anti-NRP1 de acuerdo con la reivindicación 1, que consta de un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.
5. El anticuerpo anti-NRP1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es capaz de unirse tanto al NRP1 murino como al NRP1 humano.
6. El anticuerpo anti-NRP1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
7. El anticuerpo anti-NRP1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
8. El anticuerpo anti-NRP1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
9. El anticuerpo anti-NRP1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
10. El anticuerpo anti-NRP1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo sintético.

10³
H9
108

1A



1B

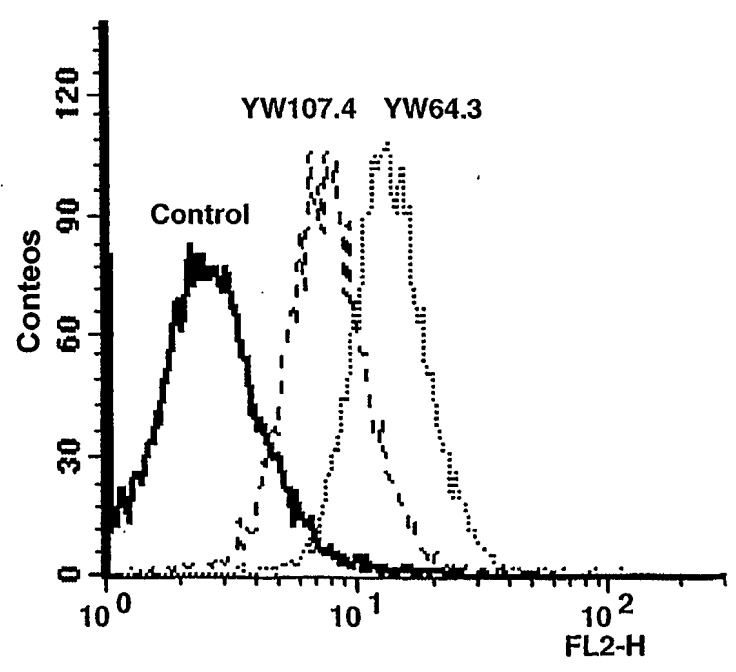
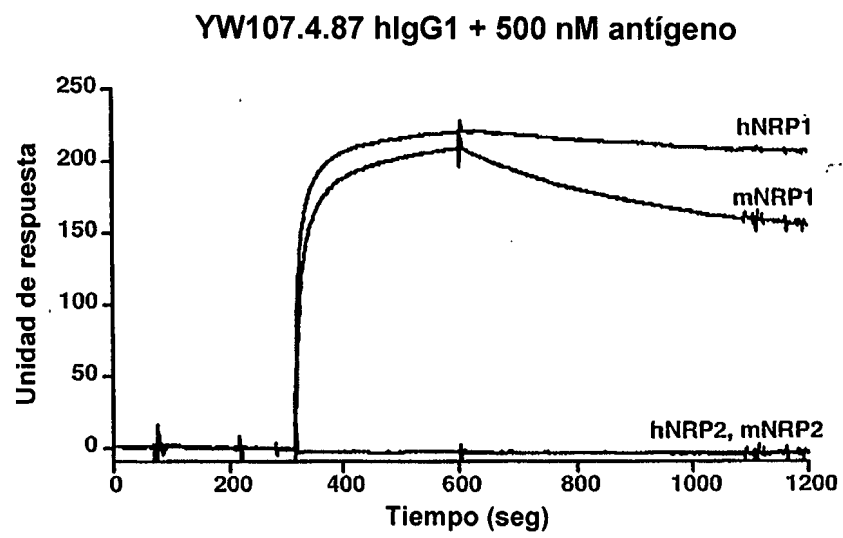


Figura 1

106
145
109

2A



2B

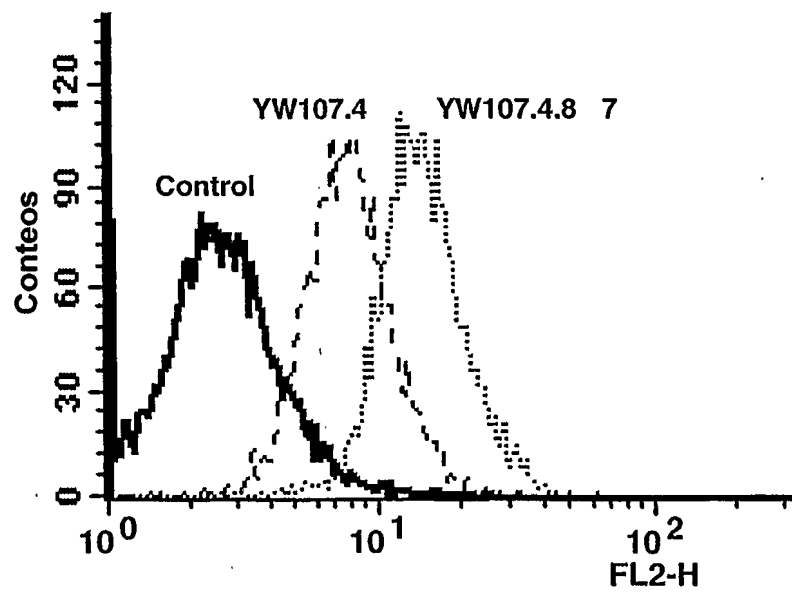


Figura 2

3 / 12

100

100

Cadena Pesada

4 / 12

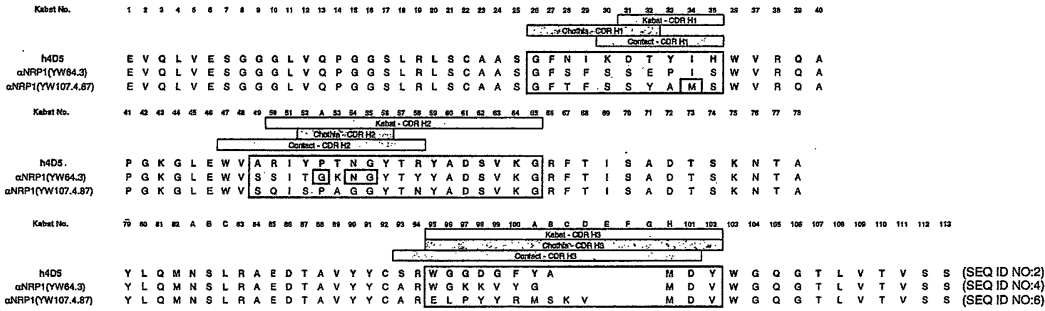


Figura 3B

108
F
=

109
148
212

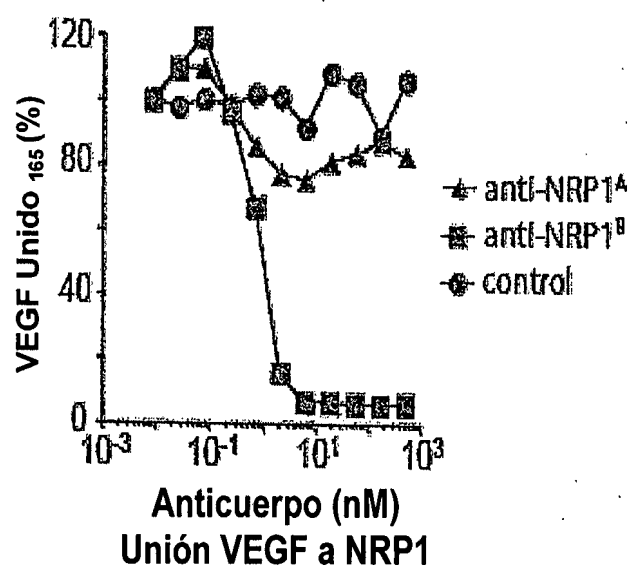
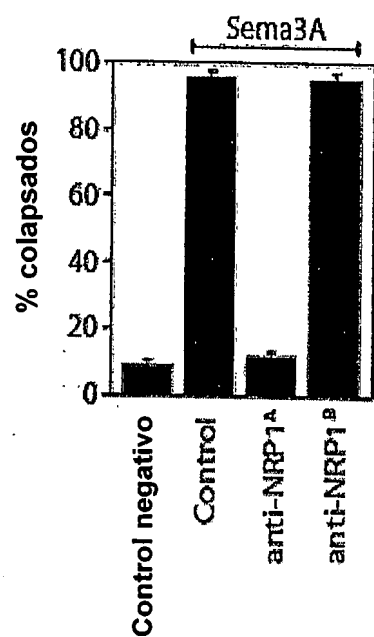


Figura 4

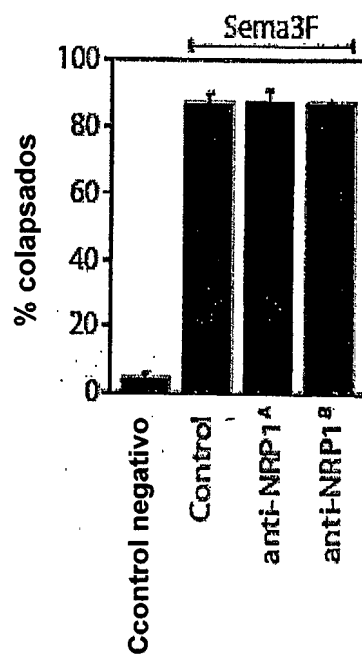
110
149
113

5A



Análisis de Colapso DRG

5B



Análisis de colapso de hipocampo

Figura 5

112
115

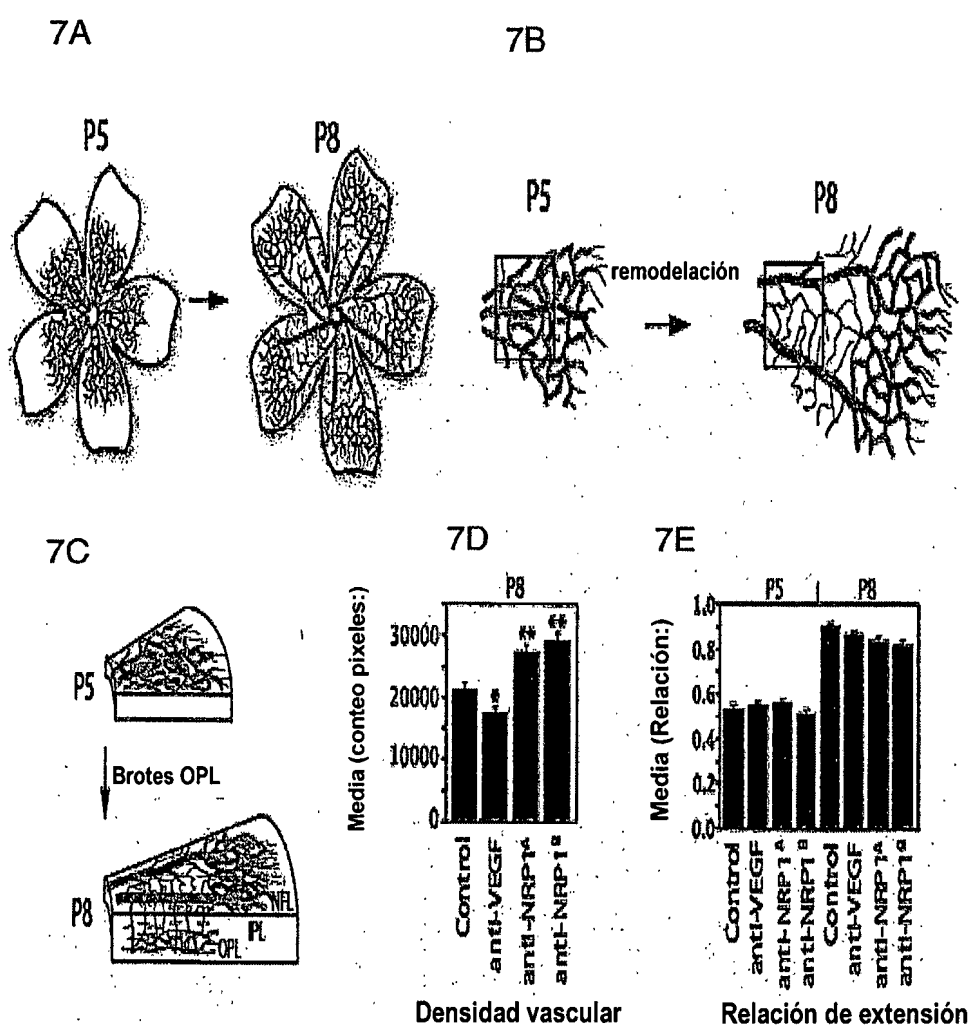


Figura 7

113
122
146

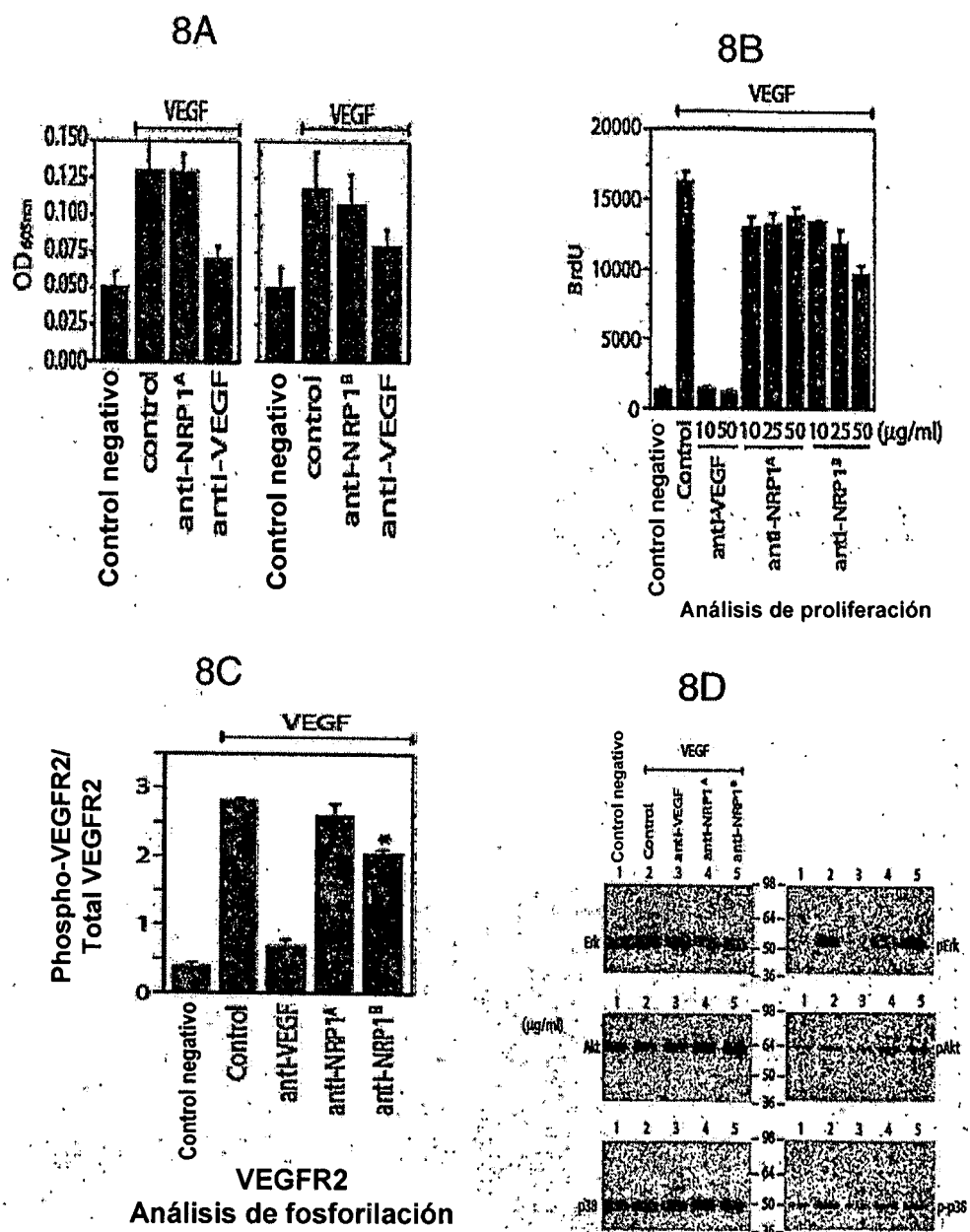


Figura 8

114
123
117

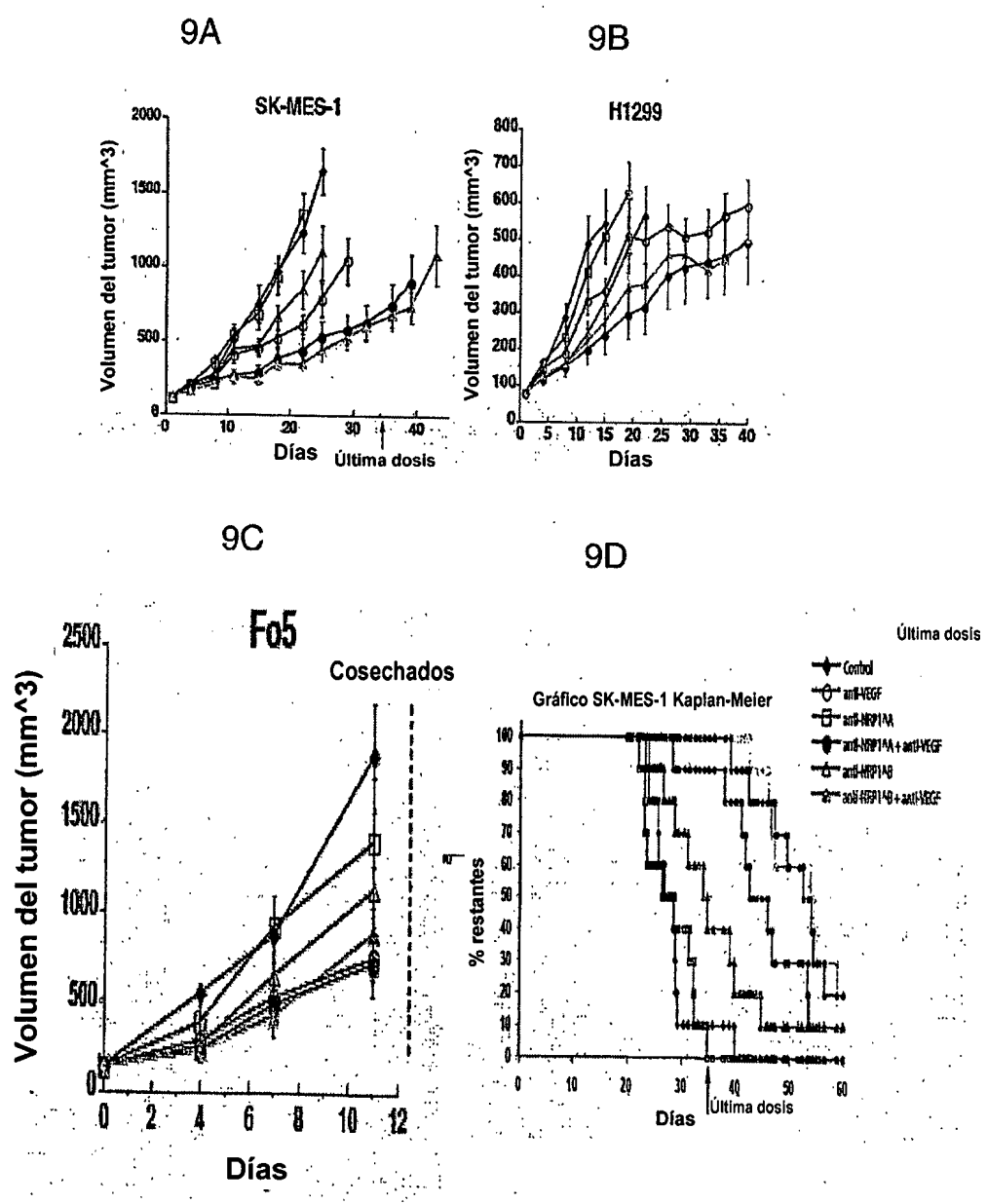


Figura 9

45
119
118

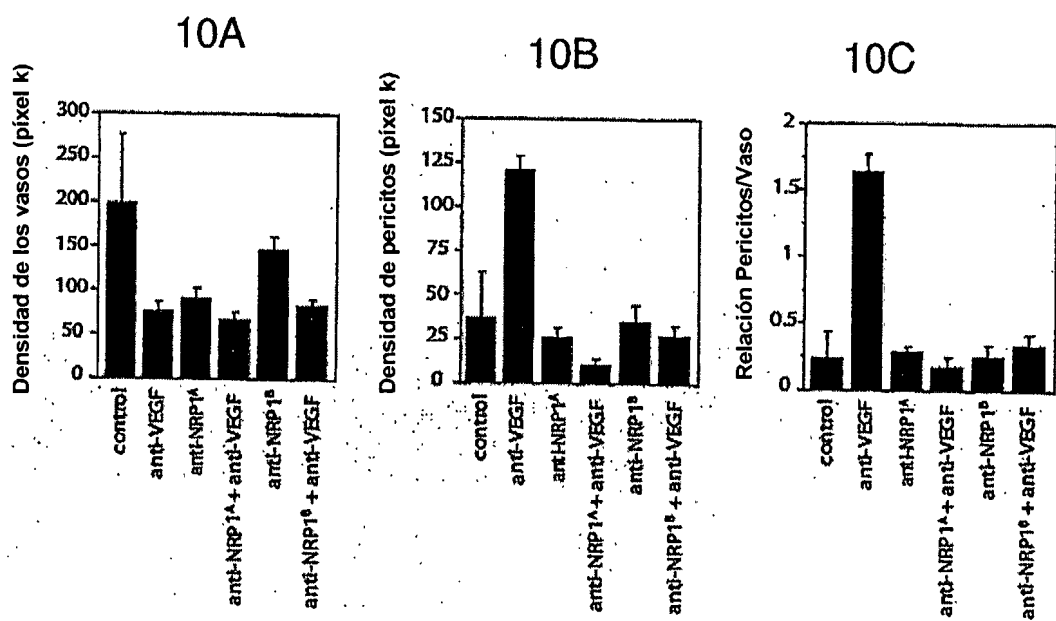
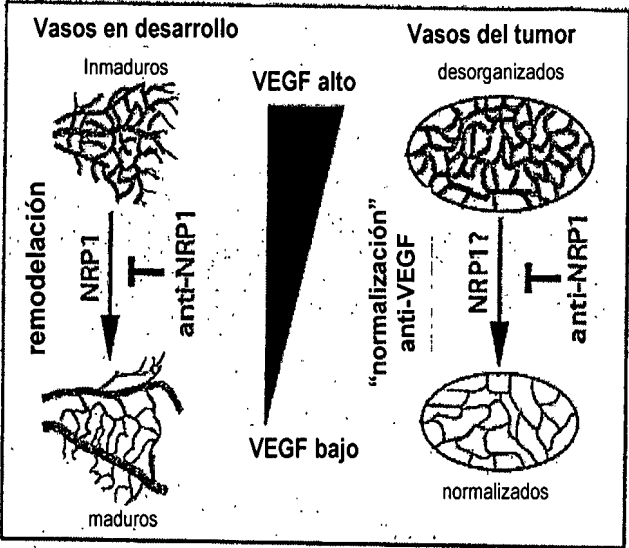


Figura 10

H6
125
119

11A



11B

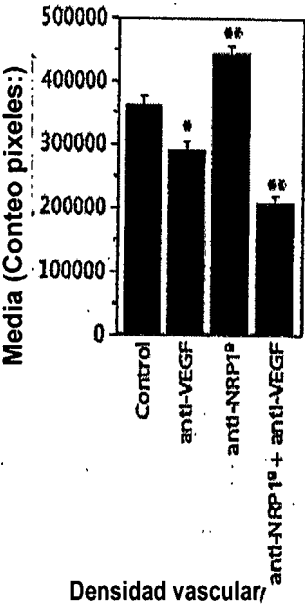


Figura 11

117
126
120

Listado de Secuencias

<110> GENENTECH, INC.

<120> ANTAGONISTAS DE NEUROPILINA

<130> P229IR1 PCT

<140> PCT/US2006/043516

<141> 2006-08-11

<150> US 60/734,798

<151> 2005-11-08

<150> US 60/820,561

<151> 2006-07-27

<160> 134

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 1

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

118

127

121

119
128
122

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 2

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
95 100 105

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 3

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

120
123
129

Tyr Met Ser Val Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 4

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

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

Ser Glu Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Gly Lys Asn Gly Tyr Thr Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly
95 100 105

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 5

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

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

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

121
190
124

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Pro Tyr Tyr Arg Met
95 100 105

Ser Lys Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

122
121
125

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 7

Tyr Met Ser Val Pro Ile

5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 8

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 9

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 10

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 11

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

123
726

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 12
Arg Tyr Ser Val Pro Ile
5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 13
Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu
5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 14
Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu
5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 15
Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu
5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

127
132
127

<400> 16
Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu
5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 17
Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu
5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 18
Phe Ser Phe Ser Ser Glu Pro Ile
5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 19
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 20
Tyr Ser Phe Ser Ser His Met Met
5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

125
123
128

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 21

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 22

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 23

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gln Leu

5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 24

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 25

Phe Thr Phe Ser Gln Tyr Ser Ile

5

126
134
129

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 26
Phe Thr Phe Thr Ser Arg Thr Met
5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 27
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 28
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
5

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

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 29
Ser Ile Thr Gly Lys Asn Gly Tyr Tyr
5

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

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

127
135
130

<400> 30
Ser Ile Ala Gly Ser Gly Gly Tyr Tyr
5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 31
Ser Ile Tyr Pro Pro Gly Gly Tyr Tyr
5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 32
Thr Ile Ile Pro His Gly Gly Tyr Tyr
5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 33
Trp Ile Ser Pro Leu Asn Gly Tyr Tyr
5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 34
Ser Ile Phe Ser Gly Gly Tyr Tyr
5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

128
130
131

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 35

Ser Ile Ser Arg Gly Asp Gly Tyr Tyr

5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 36

Thr Ile Tyr Pro Phe Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 37

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 38

Ser Ile Tyr Ser Thr Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 39

Gln Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Asn

5

129
127
132

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 40
Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly Met Asp Val
5 10

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 41
Trp Gly Gly Ser Asn Gly Ser Gly Phe Asp Tyr
5 10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 42
Trp Gly Ser Arg Ser Pro Gly Met Asp Val
5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 43
Trp Ala Lys Arg Ser Tyr Gly Met Asp Val
5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

130
138
133

<400> 44
Trp Gly Arg Arg Tyr Ile Gly Met Asp Val
5 10

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 45
Tyr Gly Asn His Val Met Asp Val
5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 46
Trp Ala Gly Gly Ser Ala Met Asp Val
5

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 47
Phe Gly Gln Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala
5 10

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 48
Trp Glu Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val
5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

131
134
134

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 49

Trp Gly Tyr Pro Gly Met Asp Val

5

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 50

Glu Leu Pro Tyr Tyr Arg Met Ser Lys Val Met Asp Val

5

10

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 51

Ser Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 52

Tyr Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 53

Tyr Ile Ser Ser Tyr

5

177
140
135

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 54
Tyr Ile Ser Ser Tyr
5

<210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 55
Tyr Ile Ser Ser Tyr
5

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 56
Tyr Ile Ser Ser Tyr
5

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 57
Tyr Ile Ser Ser Tyr
5

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

133
144
13x

<400> 58
Arg Ile Ser Ser Tyr
5

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 59
Tyr Ile Ser Ser Tyr
5

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 60
Trp Ile His Ser Tyr
5

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 61
Arg Ile His Ser Tyr
5

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 62
Tyr Ile His Ser Tyr
5

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

134
142
137

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 63

Pro Leu His Ser Tyr

5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 64

Tyr Leu Ser Ser Tyr

5

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 65

Tyr Leu Ser Ser Tyr

5

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 66

Tyr Phe Ser Ser Tyr

5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 67

Tyr Phe Ser Ser Tyr

5

135
147
186

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 68
Tyr Phe Ser Ser Tyr
5

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 69
Leu Thr His Ser Tyr
5

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 70
Arg Thr His Ser Tyr
5

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 71
Tyr Thr His Ser Tyr
5

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

136
144
139

<400> 72
Tyr Thr His Ser Tyr
5

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 73
Trp Thr His Ser Tyr
5

<210> 74
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 74
Trp Val His Ser Tyr
5

<210> 75
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 75
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 76
Gly Ala Ser Arg Arg Ala
5

<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

137
145
140

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 77

Gly Ala Ser Arg Arg Glu

5

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 78

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 79

Gly Ala Ser Arg Arg Ala

5

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 80

Gly Ala Ser Ser Arg Glu

5

<210> 81

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 81

Gly Ala Ser Ser Gly Glu

5

138
140
141

<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 82
Gly Ala Ser Arg Arg Glu
5

<210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 83
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 84
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 84
Gly Ala Ser Ser Ser Ala
5

<210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 85
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 86
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

139
147
102

<400> 86
Gly Ala Ser Arg Arg Ala
5

<210> 87
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 87
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 88
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 88
Gly Ala Ser Ser Ser Glu
5

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 89
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 90
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 90
Gly Ala Ser Thr His Glu
5

<210> 91
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

140
~~148~~
143

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 91
Gly Ala Ser Thr Leu Ala
5

<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 92
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 93
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 93
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 94
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 94
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 95
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 95
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

141
149
144

<210> 96
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 96
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 97
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 97
Gly Ala Ser Arg Leu Glu
5

<210> 98
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 98
Gly Ala Ser Ser Arg Ala
5

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 99
Tyr Ser Ser Pro Leu
5

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

142
+50
145

<400> 100
Ile Gly Ser Pro Ile
5

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 101
Leu Asn Ser Pro Leu
5

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 102
Ile Val Ser Pro Leu
5

<210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 103
Leu Arg Ser Pro His
5

<210> 104
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 104
Leu Ser Ser Pro Ile
5

<210> 105
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

143
151
146

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 105

Ile Ile Ser Pro Ile

5

<210> 106

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 106

Lys Leu Ser Pro Leu

5

<210> 107

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 107

Lys Ser Ser Pro Arg

5

<210> 108

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 108

Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 109

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 109

Tyr Ile Ser Pro Leu

5

184
152
142

<210> 110
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 110
Tyr Gly Thr Pro His
5

<210> 111
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 111
Tyr Arg Ser Pro Leu
5

<210> 112
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 112
Ile Ser Val Pro Leu
5

<210> 113
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 113
Leu Arg Ser Pro Ile
5

<210> 114
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

148
153
148

<400> 114

Ile Arg Ser Pro Leu

5

<210> 115

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 115

Ile Arg Ser Pro Leu

5

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 116

Leu Gly Ser Pro Pro

5

<210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 117

Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 118

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 118

Tyr Gly Ser Pro His

5

<210> 119

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

146
154
149

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 119

Tyr Ser Ser Pro Ile

5

<210> 120

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 120

Tyr Ser Ser Pro Val

5

<210> 121

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 121

Phe Ile Ser Pro His

5

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 122

Tyr Gly Thr Pro Ile

5

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 123

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

5

10

187
H5
150

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 124
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser
5

<210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 125
Gln Gln Tyr Met Ser Val Pro Ile Thr
5

<210> 126
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 126
Gly Phe Ser Phe Ser Ser Glu Pro Ile Ser
5 10

<210> 127
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 127
Ser Ser Ile Thr Gly Lys Asn Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 128
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

148
+56
157

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 128

Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly Met Asp Val
5 10

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 129

Arg Ala Ser Gln Tyr Phe Ser Ser Tyr Leu Ala
5 10

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 130

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser
5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 131

Gln Gln Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Thr
5

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 132

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
5 10

<210> 133

149
151
152

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

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 133
Ser Gln Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 134
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 134
Glu Leu Pro Tyr Tyr Arg Met Ser Lys Val Met Asp Val
 5 10

JP
150
158
153

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 acurso 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 desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

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

Granted and signed in **USA**

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

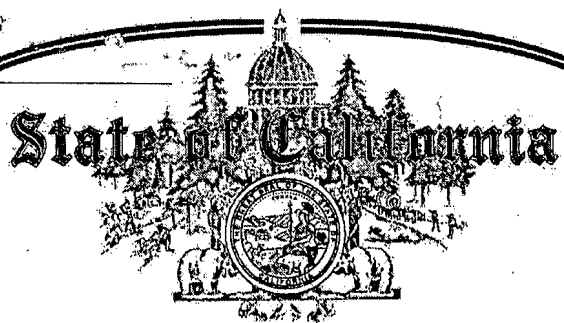
Dated

Sean Johnston

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

181
184
154

10:77:05



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.



Ernest M. Herrera
Secretary of State



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 before me,

Aida Mielat Guian

personally appeared

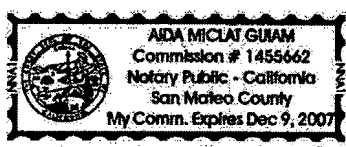
Timothy R. Schwartz

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

Name(s) of Signer(s)

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

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



WITNESS my hand and official seal.

Aida Mielat 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: _____

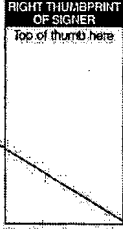
Signer(s) Other Than Named Above: _____

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: _____



152
#60
158
100

93 33

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

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

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

1. País: Estados Unidos de América
Esta 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

153
T61
156

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

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

5. at Dover, Delaware

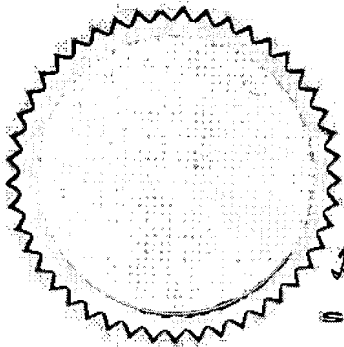
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State

154
762
157

Delaware

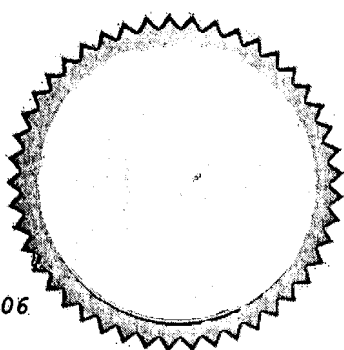
PAGE 1

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.

FILE

300



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

155
167
158

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.

156
164
139

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

157
465
100

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.

158
+66
101

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.

139
167
162

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

160
168
103

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

APOSTILLA

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

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

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

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

FECHA: 05 - 24 - 05

161
- 769
164

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 de las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

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

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Serie y 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

162
170
105

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTICULO 5

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

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

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

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

ARTICULO 6

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

2163
171
166

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.

164
172
167

ARTICULO 8

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

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

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

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

En el evento que Roche 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.

166
174
169

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

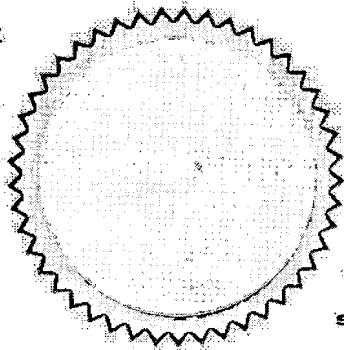
Apostille

(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

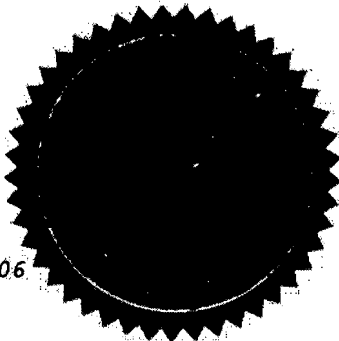
167
45
170

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."

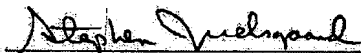
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares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

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

168
+76
171

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

169
177
172

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.

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

- Certified**

-

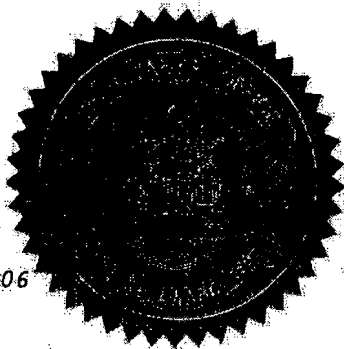
Herbert Smith Windsor
Secretary of State

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

178
179
174

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

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

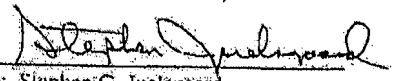
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares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

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

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

172
180
175

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

173
181
176

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.

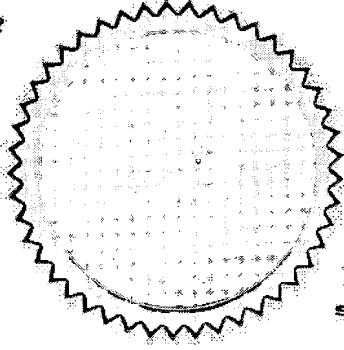
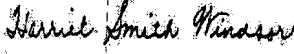
97-200
4/4

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. 0254032
9. Seal/Stamp: 
10. Signature: 

Secretary of State

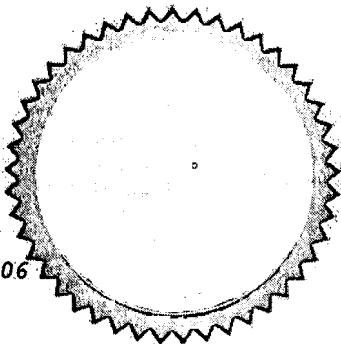
17X
182
177

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

175
183
170

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
Esté 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

176
184
179

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.

107.001

177
145
180

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by M. Bassford

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the eighteenth of June, 2008

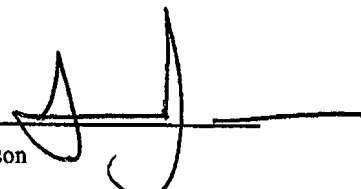
7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 08026681-3

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson



A 7130469

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME;

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office**

May 30, 2008

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
MAY 8, 2008.**

**By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**



M. Bassford
M. BASSFORD
Certifying Officer

178
486
101

PATENT ASSIGNMENT

Version v1.1
at Version v1.1

05/08/2008
500534347

SION TYPE: NEW ASSIGNMENT

E OF CONVEYANCE: ASSIGNMENT

BUYING PARTY DATA

Name	Execution Date
J. Watts	05/02/2008
Wu	05/08/2008

REIVING PARTY DATA

me:	Genentech, Inc.
reet Address:	1 DNA Way
ernal Address:	Mail Stop 49
ty:	South San Francisco
ate/Country:	CALIFORNIA
ostal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60820561

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: (650) 225-1511
Email: ely@gene.com
Correspondent Name: R. Minako Pazdera
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: Mail Stop 49
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER: PR2291-1

NAME OF SUBMITTER: R. Minako Pazdera

Total Attachments: 4
source=PR2291-1_ASSIGNMENTS#page1.tif

CH \$40.00 60820561

REEL 020917 FRAME 0859

R2291-1_ASSIGNMENTS#page2.tif
R2291-1_ASSIGNMENTS#page3.tif
R2291-1_ASSIGNMENTS#page4.tif

REEL 020917 FRAME 0860

ASSIGNMENT

WHEREAS, Ryan J. Watts, a citizen of USA, residing at 524 Yale Drive, San Mateo, CA 94402, and Yan Wu, a citizen of USA, residing at 1160 Blythe Street, Foster City, CA 94404 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

NEUROPILIN ANTAGONISTS

for which a provisional application Serial No. 60/820,561 (Docket No. PR2291-1) has been filed by them on July 27, 2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

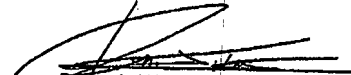
Application No. 60/820,561

Docket No. PR2291-1

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: 5/2/08


Ryan J. Watts

South San Francisco

Dated: _____

Yan Wu

180
188
183

Docket No. PR2291-1

ASSIGNMENT

WHEREAS, Ryan J. Watts, a citizen of USA, residing at 524 Yale Drive, San Mateo, CA 94402, and Yan Wu, a citizen of USA, residing at 1160 Blythe Street, Foster City, CA 94404 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

NEUROPILIN ANTAGONISTS

for which a provisional application Serial No. 60/820,561 (Docket No. PR2291-1) has been filed by them on July 27, 2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

Application No. 60/820,561

Docket No. PR2291-1

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows:

South San Francisco

Dated: _____

South San Francisco

Dated: 5/8/2008

Ryan J. Watts

Yan Wu
Yan Wu

Page 2 of 2

RECORDED: 05/08/2008

REEL 020917 FRAME 0864

184
184
184

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Cesión a GENENTECH, INC.
firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por M. Bassford
3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/timbre de la Oficina de Marcas y Patentes de E.U.

Certificado

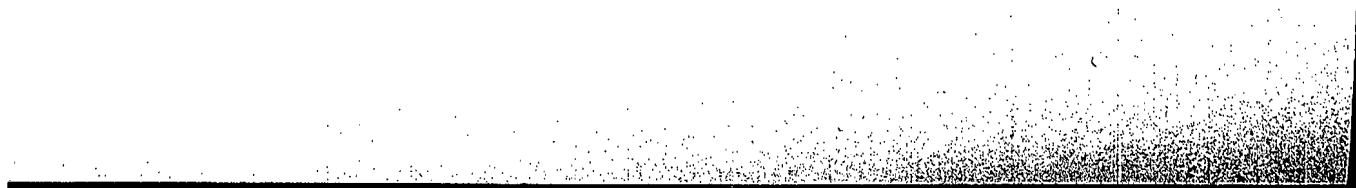
5. en Washington D.C.
6. el dieciocho de junio de 2007
7. por el Funcionario de Autenticación Asistente, Departamento de Estado
de Estados Unidos
8. No. 08026681-3
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Sonya N. Johnson

[sello]



LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGARLE LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos

Mayo 30 de 2008

ESTE ES PARA CERTIFICAR QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA
DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO ARCHIVADO
EL 8 DE MAYO DE 2008

Por autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patente de Estados Unidos

M. BASSFORD
Funcionario que Certifica

Hay un sello que dice:
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio

187
140
BS

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA												
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN												
DATOS DE LA PARTE CEDENTE:													
<table><tr><td>Nombre</td><td>Fecha de ejecución</td></tr><tr><td>Ryan J. Watts</td><td>02/05/2008</td></tr><tr><td>Yan Wu</td><td>08/05/2008</td></tr></table>		Nombre	Fecha de ejecución	Ryan J. Watts	02/05/2008	Yan Wu	08/05/2008						
Nombre	Fecha de ejecución												
Ryan J. Watts	02/05/2008												
Yan Wu	08/05/2008												
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE													
<table><tr><td>Nombre:</td><td>Genentech, Inc.</td></tr><tr><td>Dirección:</td><td>1 DNA Way</td></tr><tr><td>Dirección interna:</td><td>Mail Stop 49</td></tr><tr><td>Ciudad:</td><td>South San Francisco</td></tr><tr><td>Estado/Pais:</td><td>CALIFORNIA</td></tr><tr><td>Código Postal:</td><td>94080</td></tr></table>		Nombre:	Genentech, Inc.	Dirección:	1 DNA Way	Dirección interna:	Mail Stop 49	Ciudad:	South San Francisco	Estado/Pais:	CALIFORNIA	Código Postal:	94080
Nombre:	Genentech, Inc.												
Dirección:	1 DNA Way												
Dirección interna:	Mail Stop 49												
Ciudad:	South San Francisco												
Estado/Pais:	CALIFORNIA												
Código Postal:	94080												
NUMEROS DEL PROPIETARIO Total: 1													
<table><tr><td>Tipo de Propiedad</td><td>Número</td></tr><tr><td>Número de solicitud</td><td>60820561</td></tr></table>		Tipo de Propiedad	Número	Número de solicitud	60820561								
Tipo de Propiedad	Número												
Número de solicitud	60820561												
DATOS DE CORRESPONDENCIA													
NUMERO DE FAX: (650) 952-9881													
La correspondencia se enviará por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.													
Teléfono: (650) 225-1511													
Email: ely@gene.com													
Nombre de destinatario: Irene Pleasure													
Dirección línea 1: 1 DNA Way													
Dirección Línea 2: Mail Stop 49													
Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080													
NUMERO DE EXPEDIENTE DEL ABOGADO:	PR2291-1												
NOMBRE DEL REMITENTE:	R. Minako Pazdera												
Anexos totales: 4													
Fuente=PR2291-1_CESIONES#página 1.tif													
Fuente=PR2291-1_CESIONES#página 2.tif													
Fuente=PR2291-1_CESIONES#página 3.tif													
Fuente=PR2291-1_CESIONES#página 4.tif													

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE Ryan J. Watts, ciudadano de los E. U. A., residente en 524 Yale Drive, San Mateo, CA 94002, y Yan Wu, ciudadano de los E. U. A., residente en 1160 Blythe Street, Foster City, CA 94404 (en adelante denominados como "CEDENTES"), han inventado una invención nueva y útil en

ANTAGONISTAS DE NEUROPILINA

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serie No. 60/820,561 (Expediente No. PR2291-1) ha sido presentada por ellos el 27 de julio de 2006; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dicho CEDENTE ha y por la presente vende, cede, transfiere y traspasa a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., a disfrutar hasta su máxima extensión el derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dicho CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTE, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dicho CEDENTE por la presente garantiza y manifiesta que no ha entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

187
491
186

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco
02/05/08

Fecha

(firma)
Ryan Watts

South San Francisco

Fecha

Yan WuYan Wu

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Fecha

South San Francisco

08/05/08

Fecha

Ryan Watts

(firma)

Yan Wu

107.004 (2)

184
192
107

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by P. R. Grant

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the eighteenth of June, 2008

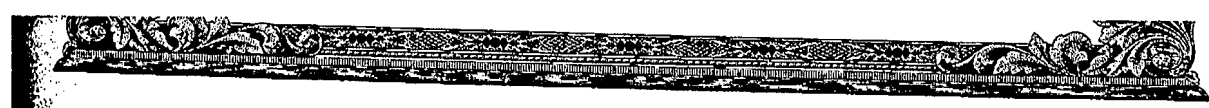
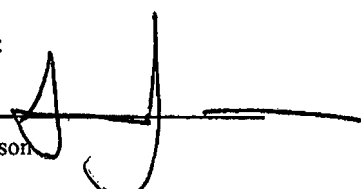
7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 08026681-5

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson



A 7120469

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office**

June 03, 2008

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
March 16, 2006.**

**By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**



P. R. Grant

**P. R. GRANT
Certifying Officer**

185
193
188

6-06 01:47pm From-GENENTECH LEGAL

+6508520881

T-356 P.02/06 F-781

**RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY**

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

Commissioner for Patents: Please record the attached original documents or copy thereof.

Any Dkt No. PR2291

1. Name of conveying party(ies):

Ryan J. Warrs
Anil D. Bagri
Yan Wu

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: GENENTECH, INC.

Internal Address:

Street Address: 1 DNA Way

City: South San Francisco State: California

ZIP: 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

☒ Assignment

Merger

Security Agreement

Change of Name

Other:

Execution Date: March 10, 2006, March 13, 2006 and
March 11, 2006

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No (s)

60/734,798

B. Patent No (s)

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Steven X. Cui
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

6. Total number of applications and patents involved: 1

7. Total fee (37 CFR 3.41): \$ 40.00

☐ Enclosed

☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

07-0630

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Steven X. Cui
Name of Person Signing
Registration No. 44,637

Steven X. Cui
Signature

March 16, 2006
Date

Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document: 5

Revised (10/1/94)

CH \$40.00 070630 60734798

700251278

PATENT
REEL: 017345 FRAME: 0989

Docket No. PR2291

ASSIGNMENT

WHEREAS, Ryan J. Watts, a citizen of USA, residing at 524 Yale Drive, San Mateo, CA 94402, and Anil D. Bagri, a citizen of USA, residing at 1 Maple Way, San Carlos, CA 94070, and Yan Wu, a citizen of US, residing at 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

NEUROPILIN ANTAGONISTS

for which a provisional application Serial No. 60/734,798 (Docket No. PR2291) has been filed by them on November 8, 2005; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4490, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

186
144
189

06 01:47pm From-GENENTECH LEGAL

+6508628881

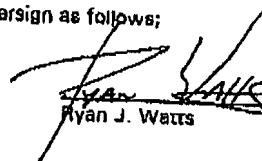
T-956 P.04/06 F-781

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: 3/10/06


Ryan J. Watts

South San Francisco

Dated: _____

Anil D. Bagn

South San Francisco

Dated: _____

Yan Wu

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows:

South San Francisco

Dated: _____

Ryan J. Watts

South San Francisco

Dated: 3/13/06

Anil D. Bagri
Anil D. Bagri

South San Francisco

Dated: _____

Yan Wu

187
145
190

6 01:48pm From-GENENTECH LEGAL

+6509528881

T-358 P.06/06 F-781

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows:

South San Francisco

Dated: _____

Ryan J. Watts

South San Francisco

Dated: _____

Anil D. Bagri

South San Francisco

Dated: 3-11-2006

Yan Wu
Yan Wu

Page 2 of 2

RECORDED: 03/16/2006

PATENT
REEL: 017345 FRAME: 0993

18-
TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Cesión a **GENENTECH, INC.**
firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por P. R. Grant
3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/timbre de la Oficina de Marcas y Patentes de E.U.

Certificado

5. en Washington D.C.
6. el dieciocho de junio de 2008
7. por el Funcionario de Autenticación Asistente, Departamento de Estado
de Estados Unidos
8. No. 08026681-5
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Sonya N. Johnson

[sello]

188
146
191

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGARLE LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos

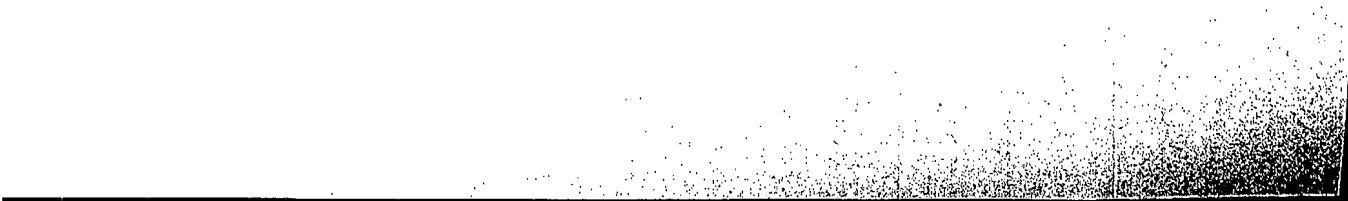
03 de junio de 2008

ESTE ES PARA CERTIFICAR QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA
DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO ARCHIVADO
EL 16 DE MARZO DE 2008.

Por autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patente de Estados Unidos

(Firma)
P. R. GRANT
Funcionario que Certifica

Hay un sello que dice:
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio



HOJA DE PORTADA DEL FORMULARIO DE REGISTRO SOLAMENTE PATENTES		Departamento de Comercio de Estados Unidos Oficina de Marcas y Patentes
Comisionado de Patentes: Por favor archive los documentos originales anexos o copias de los mismos		
1. Nombre de la(s) parte(s) cedente(s): Ryan J. Watts Anil D. Bagri Yan Wu ¿Se anexa(n) nombre(s) adicional(es) de parte(s) cedente(s)? _ Si ☒ No	2. Nombre y dirección de la(s) parte(s) receptora(s) Nombre: <u>GENETECH, INC</u> Dirección interna: Dirección: <u>South San Francisco</u> Estado: <u>California</u> Código Postal: <u>94080-4990</u> ¿Se anexan Nombre(s) y dirección(es) adicional(es)? _ Si ☒ No	
3. Naturaleza del traspaso: ☒ Cesión Fusión Acuerdo de Seguridad Cambio de Nombre Otro: Fecha de Ejecución: <u>10 de marzo de 2006, 13 de marzo de 2006 y 11 de marzo de 2006</u>		
4. Numero(s) de solicitud o número(s) de patente: Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: A. Solicitud de patente No(s). <u>60/734,798</u> B. Patente No(s). ¿Se anexan números adicionales? _ Si ☒ No		
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar la correspondencia: Steven X. Cui Genetech, INC. 1 DNA Way South San Francisco, CA 94080	6. Numero total de solicitudes y patentes involucradas: <u>1</u>	
	7. Tarifa total (37 C.F.R 3.41): <u>\$40.00</u> - Adjunto ☒ Autorizado a cargar a la cuenta de depósitos	
	8. Número de cuenta de Depósito: <u>07-0630</u>	
NO USE ESTE ESPACIO		
9. Declaración y firma. Hasta donde sé y creo, la información anterior es verdadera y correcta y cualquier copia anexa es una copia verdadera del documento original. NSteven X Cui (Firma) 16 de marzo de 2006 Nombre de la persona que firma Firma Fecha Registro No. 44,637 Número total de páginas que comprenden portada, anexos y documento: 5		

700251278

PATENTE
ROLLO: 017345 CUADRO: 0989

189
197
192

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE Ryan J. Watts, ciudadano de los E. U. A., residente en 524 Yale Drive, San Mateo, CA 94002, Anil D. Bagri, ciudadano de los E. U. A., residente en 1 Maple Way, San Carlos, CA 94070, y Yan Wu, ciudadano de los E. U. A., residente en 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404 (en adelante denominados como "CEDENTES"), han inventado una invención nueva y útil en

ANTAGONISTAS DE NEUROPILINA

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serie No. 60/734,798 (Expediente No. PR2291) ha sido presentada por ellos el 8 de noviembre de 2005; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una contraprestación buena y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por la presente, dicho CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., a disfrutar hasta su máxima extensión el derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de Interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dicho CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTE, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrarán en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco
02/05/08
Fecha

(firma)
Ryan Watts

South San Francisco

Fecha

Anil D. Bagn

South San Francisco

Fecha

Yan WuYan Wu

190
198
193

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrarán en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Fecha

Ryan Watts

South San Francisco

13/03/06

Fecha

(firma)

Anil D. Bagri

South San Francisco

Fecha

Yan Wu

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrarán en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Fecha

Ryan Watts

South San Francisco

Fecha

Anil D. Bagri

South San Francisco

11-03-06

Fecha

(Firma)

Yan Wu