Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPI
División de Nuevas

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-034643-A-00000-0000
Fecha: 2013-01-09 16:23:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 328

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 2008 034.643 A

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS PARA CINASA-1 SIMILAR A RECEPTOR DE ACTIVINA

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** PFIZER INC., y AMGEN FREMONT INC.,

DOMICILIO CALIFORNIA, FREMONT, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA y NEW YORK, NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 7 de Abril de 2008.

(FORMA P-10)

9
1

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-034643-A-00000-0000
Fecha: 2013-01-09 16:23:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 328

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

☐ **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 ☒

PFIZER INC., y AMGEN FREMONT INC.,

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

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 y Estados Unidos de América Respectivamente	235 E. 42nd Street, 20 Floor, New York 10017-5755 y 6701 Kaiser Drive, California 94555 Respectivamente	New York y Fremont Respectivamente

Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

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

2

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional
De Páez Luz Clemencia	C.C. 35.456.344	T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

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

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____	Expediente : **08.034.643**	Expediente_____
De: _____	De: _____	De: _____
A: _____	A: _____	A: _____

5. **Comprobante de Pago No.** 12-0095941 **Fecha:** 18 de septiembre de 2012
Comprobante de Pago No. 12-0096769 **Fecha:** 20 de septiembre de 2012

6. Anexos

- [x] Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- [x] Comprobante de pago por 12 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $ 360.000
- [x] Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- [x] 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 **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**	Firma Luz Clemencia de Páez
C.C 35.456.344 de Usaquén	Tarjeta Profesional T.P. 23.555

DRD\NCA\WPC15413\ID-226166

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No 08.034.643. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 11185 notificado por fijación en lista del 27 de junio de 2012. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 07 de abril de 2008 y la prioridad que allí se reivindican del 07 de septiembre de 2005.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 08.034.643

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-034643- -00000-0000
Fecha: 2008-04-07 16:57:10 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 516

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 7 abril 2008

SOLICITUD DE:

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

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **AMGEN FREMONT INC.**
y
PFIZER INC.
sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 6701 Kaiser Drive,
Fremont,
California 94555,
Estados Unidos de América

Y

235 E. 42nd Street, 20 Floor,
New York,
New York 10017-5755,
Estados Unidos de América

Domicilio: Fremont,
California,
Estados Unidos de América

Y

New York,
New York,
Estados Unidos de América

Respectivamente

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

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Michael Aidan NORTH**
15047 El Camino Real,
Rancho Santa Fe,
California 92014,
Estados Unidos de América

2. **Karin Kristina AMUNDSON**
2033 1/2 Morena Boulevard,
San Diego,
California 92110,
Estados Unidos de América

3. **Vahe BEDIAN**
35 Overlook Drive East,
Framingham,
Massachusetts 01701,
Estados Unidos de América

4. **Shelley Sims BELOUSKI**
4541 La Tuna Court,
Camarillo,
California 93012,
Estados Unidos de América

5. Dana Dan HU-LOWE
942 Arden Drive,
Encinitas,
California 92024,
Estados Unidos de América

6. Xin JIANG
7556 Charmant Drive, #1722,
San Diego,
California 92122,
Estados Unidos de América

7. Shannon Marie KARLICEK
3717 Nobel Drive, Unit 1318,
San Diego,
California 92122,
Estados Unidos de América

8. Sirid-Aimee KELLERMANN
1000 Almanor Avenue,
Menlo Park,
California 94025,
Estados Unidos de América

9. James Arthur THOMSON
8931 Haveteur Way,
San Diego,
California 92123,
Estados Unidos de América

10. Jianying WANG
7478 Park Village Road,
San Diego,
California 92129,
Estados Unidos de América

11. Grant Raymond WICKMAN
4249 Nobel Drive, #38,
San Diego,
California 92122,
Estados Unidos de América

12. Jingchuan ZHANG
4790 West Moorhead Circle,
Boulder,
Colorado 80305,
Estados Unidos de América

(5) **PCT (86)**
Solicitud Internacional No. PCT/US2006/035096 Fecha: 6 de septiembre de 2006
Publicación Internacional No. WO 2007/040912 A2 Fecha: 12 de abril de 2007

(6) **Título (54)**
ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS PARA CINASA-1 SIMILAR A RECEPTOR DE ACTIVINA

(7) **Clasificación Internacional (51)** A61K 039/395

(8) **Prioridad** SI☒ NO☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	7 de septiembre de 2005	60/715,292

(9) **Comprobante de pago No.:** 07-74,937 **Fecha:** 17 de septiembre de 2007
08- 231 2 de enero de 2008
08-23,335 17 de marzo de 2008
08-23,285 17 de marzo de 2008

10

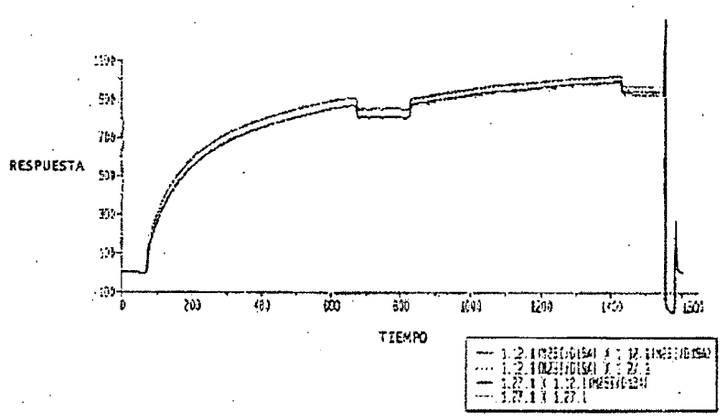
Anexos:

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 501.000.oo.
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] 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.
- [x] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [x] 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.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

FIG. 1



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

AHP

23
7

ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS PARA CINASA-1 SIMILAR A RECEPTOR DE ACTIVINA

Esta solicitud reivindica la prioridad según 35 la U.S.C. § 119(e) de las solicitud provisional de los Estados Unidos 60/715, 292, presentada en Septiembre 7, de 2005, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con los anticuerpos monoclonales y con las porciones de unión a antígeno de estos que se unen al dominio extracelular (ECD), de la cinasa-1 similar al receptor de activina (ALK-1), La invención también se relaciona con las moléculas de ácido nucleico que codifican tales anticuerpos y con las porciones de unión a antígeno, los métodos para elaborar anticuerpos anti-ALK-1 humanos y porciones de unión a antígeno, composiciones que comprenden estos anticuerpos y, porciones de unión a antígeno y métodos de uso de los anticuerpos, porciones de unión a antígeno, y composiciones.

Antecedentes de la Invención.

El ALK-1 es un receptor de superficie celular tipo I para transformar el receptor beta de factor de crecimiento tipo I (TGF-beta-1). El ALK-1 humano es un polipéptido de 503 aminoácidos, que incluye una secuencia de señal (aminoácidos 1-21), un dominio de unión de ligando TGF-beta-1 extracelular del terminal N o ECD (aminoácidos 22-118), un dominio de transmembrana simple (aminoácidos 119-141) un dominio rico en glicina/serina regulador (GS) (aminoácidos 142-202) y un Terminal C, un dominio cinasa serina-treonina (aminoácidos 202-492). La

secuencia de aminoácido del ALK-1 humano descrita en Attisano et al. *Cell*, 1993, vol. 75. pp. 671-680 incluye Ser en la posición 172 (registro Genbank L17075), mientras que la Patente U.S. No. 6.316.217 reivindica la secuencia de aminoácido de ALK-Humano con Thr en la posición 172 (registro Genbank NM_000020). El gen ACVRL1 codifica un ALK-1 humano de longitud completa descrito en Attisano et al. está disponible comercialmente de Invitrogen Inc., ID Clon IOH21048. Aunque el ALK-1 comparte de 60-80% de homología total con otros receptores tipo I (ALK-2 a ALK-7), El ECD de ALK-1 es remarcablemente divergente de los ECD de otros miembros de la familia ALK. Por ejemplo, en los humanos, solo el ECD de ALK-2 está relacionado de manera significativa al ECD del ALK-1 (compartiendo aproximadamente 25% de identidad de aminoácidos). La Patente U.S. No. 6.316.217; ten Dijke et al., *Oncogene*, 1993, vol. 8, pp. 2879-2887; Attisano et al, *Cell*, 1993, vol. 75, pp. 671-680.

En general, la superfamilia de ligandos TGF-beta ejercen sus actividades biológicas por vía de la unión a los complejos receptores heteroméricos de dos tipos (1 y 11) de cinasas serina/treonina. Los receptores tipo II son cinasas activas constitutivamente que fosforilan el receptor tipo I luego de ligando de unión. A su vez, las cinasas tipo I activadas fosforilan moléculas de señalización en dirección de 3' que incluyen los diferentes Smads, que desplazan el núcleo y llevan a una respuesta transcripcional. Holding et al. *Nature*, 1997, vol. 390, pp. 465-471. En el caso de ALK-1, hemos mostrado que el Smad1 se fosforila específicamente y se desplaza al núcleo en donde regula directamente la expresión de los genes de respuesta a Smad1 Id1 y EphB2.

El ALK-1 se expresa alta y selectivamente en las células endoteliales y otros tejidos altamente vasculares tales como la placenta o cerebro. Hemos

mostrado mediante un perfil Afftmetrix y RT-PCR en tiempo real que la expresión de ALK -1 en las células endoteliales excede altamente la expresión de sus co-receptores activina tipo II y endoglina, su ligando TGF-beta-1 o ALK-5. Las mutaciones en ALK-1 están asociadas con la telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), sugiriendo un papel crítico del ALK-1 en el control del desarrollo o reparación de los vasos sanguíneos. Abadia et al. *J. Med. Genet.*, 2003, vol. 40, pp. 494-502; Sadick et al. *Hematologica/The Hemaology J.,* 2005, vol. 90, pp. 818-828. Adicionalmente, dos estudios independientes de ratones transgénicos ALK-1 proporcionan la clave *in vivo* de la evidencia para la función del ALK-1 durante la angiogénesis. Oh et al. *Proc Natl. Acad.* Sci. U.S., 2000, vol. 97, pp. 2626-2631; Urness et al. *Nature Genetics*, 2000, vol. 26, pp. 328-331.

La angiogénesis es el proceso fisiológico que involucra la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de de vasos preexistentes y/o la circulación de células madre endoteliales. Este es un proceso normal en el crecimiento y desarrollo, así como también en la cicatrización de heridas. Sin embargo, este también es una etapa fundamental en la transición de los tumores a partir de un estado latente hacia un estado maligno. Hanaban y Folkman, "Pattems and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis, " *Cell*, 86(3):353-364, 1996; Carmeliet, "Angiogenesis in Health and Disease, " *Nature Medicina*, 9(6):653-660, 2003; Bergers y Benjamina, "Tumoreigenesis and the Angiogenis Switch, " *Nature Reviews*, 3:401-410, 2003. En las enfermedades como el cáncer, el cuerpo pierde la capacidad para mantener una angiogénesis balanceada. Los nuevos vasos sanguíneos alimentan los tejidos enfermos, destruyen los tejidos normales, y, en el caso de algunos cánceres, los nuevos vasos sanguíneos pueden permitir que las células del tumor se escapen en la circulación y se alojen en otros órganos (metástasis del tumor). Los inhibidores de

angiogénesis que incluyen los anticuerpos monoclonales (mAbs), son una clase de droga muy promisoria objetivada contra este proceso anormal para bloquear o disminuir el crecimiento del tumor.

En adición a un rol en el crecimiento de un tumor sólido y metástasis, otras afecciones notables con un componente angiogénico son, por ejemplo, artritis, soriasis, degeneración macular neo-vascular relacionada con la edad y retinopatía diabética. Bonnet et al. "Osteoarhtritis, Angiogenesis and Inflammation; " *Rheumatology*, 2005, vol. 44, pp. 7-16; Creamer et al. "Angiogenesis in psoriasis" *Angiogenesis* 2002, vol 5, 231-236 Clavel et al "Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid artritis" *Joint Bone Spina*, 2003, vol. 70, pp. 321-326; Anandarajah et al. "Pathogenesis of psoriatic artritis", *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004, vol. 16, pp. 338-343; Ng et al. "Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration, " Can. J. Opthalmol., 2005, vol. 40, pp. 352-368; Witmer at al. "Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease, " *Progress in Retinal & Eye Research*, 2003, vol. 22, pp. 1-29; Adamis et al. "Angiogenesis and ophthalmic disease, " *Angiogenesis*, 1999, vol. 3, pp. 9-14.

Las terapias anti-angiogénicas se esperan que sean de naturaleza crónica. De acuerdo con esto, los objetivos con función endotelial altamente selectiva, tal como ALK -1, se prefieren para reducir el desgaste que resulta de los efectos colaterales. Adicionalmente, dada la remarcable divergencia del ALK-1 ECD de los ECD de los otros miembros de la familia ALK, el mAb surge contra el ALK-1 ECD humano se espera que objetive selectivamente al ALK-1. Con base a estas consideraciones, un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular ALK-1 que pueda inhibir la dimerización con el receptor tipo II y, por lo tanto, bloquear la

fosforilización Smad1 y la respuesta transcripcional con dirección a 3' es altamente deseable.

R&D Systems, Inc. elabora y vende un anticuerpo ALK-1 anti-humano monoclonal (Cat. # MAB370) producido a partir de una hibridoma que resulta de la fusión de mieloma de ratón con células B obtenidas de un ratón inmunizado con dominio extracelular ALK-1 humano recombinante derivado de NSO purificado. Hemos mostrado que estos anticuerpos no neutralizan la interacción entre el ALK-1 y el TGF-beta-1, ni abroga la fosforilización del Smad1. Se han generado anti-sueros de conejo contra un péptido sintético que corresponde a una parte de la región yuxtamembrana intracelular de ALK-1 (residuos aminoácidos 145-166), acoplados a hemocianina de lapa (KLH), (Patente U.S. No. 6.692.925) y contra todo el dominio extracelular ALK-1 excepto por la secuencia delantera (Lux et al. *J. Biol. Chem.,* 1999, vol. 274, pp. 9984-9992). Abadía et al. (*Human Mol. Gen.*, 2000, vol. 9, pp. 1227-1237) reporta la generación de un anticuerpo policlonal para el ALK-1 utilizando una construcción de virus de vacuna recombinante. R%D Systems, Inc. elabora y vende un anticuerpo policlonal anti-humano ALK-1 (Cat. # AF370) producido en cabras inmunizadas con dominio extracelular ALK-1 recombinante derivado de NSO purificado.

Hasta hoy, no se han reportado completamente anticuerpos monoclonales humanos al ECD del ALK-1, y no se ha demostrado la eficacia de ningún anticuerpo monoclonal al ECD del ALK-1 en abrogar la ruta de señalización del ALK-1/TGF-beta/Smad1.

Resumen de la Invención

La invención pertenece a la neutralización aislada de los anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 o porciones de unión a antígeno de estos que se unen al ALK-1 primato, preferiblemente el ECD de ALK-1 de primato, más preferiblemente el ECD de ALK-1 de humano. En una modalidad preferida, los anticuerpos neutralizantes son anticuerpos monoclonales completamente humanos o porciones de unión a antígeno.

En otro aspecto, la presente invención es un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este cuyo anticuerpo o porción de unión a antígeno de este abroga la ruta de señalización del ALK-1/TGF-beta-1/Smad1. En una modalidad preferida, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos o porciones de unión a antígeno de estos.

En otro aspecto, la presente invención es un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este cuyo anticuerpo o porción de unión a antígeno de este es un antagonista de la angiogénesis estimulada por TGF-beta-1. En una modalidad preferida, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos o porciones de unión a antígeno.

En otro aspecto, la presente invención es un anticuerpo anti-ALK-1 completamente humano o porción de unión a antígeno de este cuyo anticuerpo o porción de unión a antígeno de este es un antagonista de la angiogénesis de tumor estimulada por TGF-beta-1.

En otro aspecto, la presente invención es un anticuerpo bien tolerado, inyectable, ALK-1 completamente humano o porción de unión a antígeno de este cuyo anticuerpo o porción de unión a antígeno de este es un antagonista de la angiogénesis estimulada por TGF-beta-1.

En otro aspecto, la presente invención es un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este cuyo anticuerpo o porción de unión a antígeno de este inhibe la regulación de un gen objetivo con dirección a 3' específico de ALK-1, Id1. En una modalidad preferida, los anticuerpos son anticuerpos totalmente humanos o porciones de unión a antígeno de estos.

En otro aspecto, la presente invención es un anticuerpo monoclonal anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno de este se describe en términos de por lo menos uno de varias propiedades que se describen adelante.

Por ejemplo, en una modalidad el anticuerpo o porción de unión a antígeno de este se une al dominio extracelular del ALK-1 de primate con un valor de avidez de 1 μM o menos como se mide mediante resonancia de un plasmón de superficie. En una modalidad adicional, el anticuerpo o porción que se une antígeno de este se une al dominio extracelular de ALK-1 primate con un valor de avidez de menos de 100 nM, menos de 5 nM, menos de 1 nM, menos de 500 pM, menos de 100 pM, menos de 50 pM, menos de 20 pM, menos de 10 pM, o menos de 1 pM, según como se mide por resonancia plasmón de superficie. En ciertas modalidades, el valor de avidez es desde 0, 1 pM hasta 1 μM. En otras modalidades, el valor de avidez es desde 1 pM hasta 100 nM. En otras modalidades, el valor de avidez es desde 1 pM hasta 5 nM. En otras modalidades, el valor de avidez es desde 1 pM hasta 500 pM. En otras modalidades, el valor de

avidez es desde 1 pM hasta 100 pM. En otras modalidades, la avidez es de 1 pM a 10 pM.

En otra modalidad, el anticuerpo o porción de unión a antígeno de este se une al dominio extracelular del ALK-1 humano con un valor de avidez de 100 nM o menos según se mide mediante resonancia de plasmón de superficie. En una modalidad adicional, el anticuerpo o porción de unión a antígeno de este se une al dominio extracelular del ALK-1 humano con un valor de avidez de menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 1 nM, menos de 500 pM, menos de 100 pM, menos de 50 pM, menos de 20 pM, menos de 10 pM, o menos de 1 pM, según se mide mediante resonancia de plasmón de superficie. En ciertas modalidades, el valor de avidez es desde 1 pM hasta 100 pM. En otras modalidades, el valor de avidez es desde 1 pM hasta 5 nM. En otras modalidades, el valor de avidez es desde 1 pM hasta 500 nM. En otras modalidades, el valor de avidez es desde 1 pM hasta 100 pM. En otras modalidades, la avidez es desde 1 pM hasta 10 pM.

En otra modalidad, el anticuerpo o porción de unión a antígeno de este tiene un constante de disociación (k_{dis}) para el ALK-1 humano de $5 \times 10^{-3}s^{-1}$ o más pequeño según como se mide mediante resonancia de plasmón de superficie. Por ejemplo, en ciertas modalidades el anticuerpo o porción tiene una k_{dis} para el ALK-1 humano de menos de $10^{-3}s^{-1}$, más pequeño que $5 \times 10^{-4}s^{-1}$, más pequeño que $10^{-4}s^{-1}$, más pequeño que $5 \times 10^{-5}s^{-1}$, más pequeño que $10^{-5}s^{-1}$, o más pequeño que $5 \times 10^{-6}s^{-1}$. En otras modalidades, el k_{dis} es desde $10^{-6}s^{-1}$ hasta $5 \times 10^{-5}s^{-1}$.

En otra modalidad, el anticuerpo o porción de unión a antígeno de este se une al ALK-1 de primate con un K_D de 1000 nM o menos. En una modalidad adicional, el anticuerpo o porción de unión a antígeno de este se une al ALK-1

humano con un K_D de menos de 500 nM, menos de 100 nM, menos de 50 nM, menos de 20 nM, menos de 10 nM, o menos de 1 nM, según se mide mediante resonancia de plasmón de superficie. En ciertas modalidades, el K_D es desde 1 µM hasta 100 nM. En otras modalidades, el K_D es desde 100 nM hasta 10 nM. En otras modalidades, el K_D es desde 50 nM hasta 0, 1 nM. Tales valores de K_D se pueden medir mediante cualquier técnica conocida por aquellos expertos en el arte, tal como por ELISA, RIAs, citometría de flujo, o por resonancia de plasmón de superficie, tal como BIACORE™.

En otra modalidad, el anticuerpo o porción de unión a antígeno de este tiene una mayor afinidad de unión al ALK-1 de primate ($K_D(P)$) que por el ALK-1 de roedor ($K_D(R)$). En una modalidad, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de estos de la presente invención tienen una ($K_D(R)$)/($K_D(P)$) que es mayor que o igual a 1, 5. En una modalidad adicional los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de estos tienen un ($K_D(R)$)/($K_D(P)$) que es mayor de o igual a 2, mayor de o igual a 3, mayor de o igual a 5, mayor de o igual a 10, mayor de o igual a 20, mayor de o igual a 50, mayor de o igual a 100, mayor de o igual a 200, mayor de o igual a 500, o mayor de o igual a 1000. Tales valores de K_D tanto para el ALK-1 de primate como por el ALK-1 de roedor pueden ser medidos mediante cualquier técnica conocida por aquellos expertos en la técnica, tales como mediante citometría de flujo, ELISA, RIA o resonancia de plasmón de superficie, tal como BIACORE™.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este tiene un IC_{50} de 500 nM o menos según se mide por su capacidad para inhibir la sobre-regulación de un gen objetivo con dirección 3' específico de ALK-1, Id1. En una modalidad adicional, dicho IC_{50} es menor de 300 nM, menor de 200

nM, menor de 150 nM, menor de 100 nM, menor de 50 nM, menor de 20 nM, menor de 10 nM, o menor de 1 nM. En ciertas modalidades, el IC_{50} es desde 10 nM hasta 100 nM.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este tiene un IC_{50} de 250 nM o menor según se mide por su capacidad para inhibir la fosforilización Smad1 determinada por Western Blotting utilizando Odyssey Infrared Imaging System. En una modalidad adicional, dicho IC_{50} es menor de 200 nM, menor de 150 nM, menor de 100 nM, menor de 50 nM, menor de 20 nM, menor de 10 nM, o menor de 1 nM. En ciertas modalidades, el IC_{50} es desde 1 nM hasta 250 nM. En otras modalidades, el IC_{50} es desde 5 nM hasta 200 nM. En otras modalidades el IC_{50} es desde 10 nM hasta 100 nM.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este inhibe la angiogénesis de los vasos humanos en un ratón SCDI injertado con tejido de prepucio humano, en el cual las células de tumor de M24met melanoma humano se implantan intradérmicamente como se determina por el análisis IHC de ensayo de señal CD-31 humano por al menos 40% según se compara con una muestra de control. En una modalidad adicional, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este inhibe la angiogénesis de los vasos humanos en un ratón SCDI injertado con tejido de prepucio humano, en el cual las células de tumor M24met de melanoma humano se implantan intradérmicamente por al menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, o por lo menos 60% cuando se compara a una muestra de control.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este tiene un IC_{50} de 500 nM o menos según se mide por su capacidad para inhibir la angiogénesis

de los vasos humanos en un ratón SCDI injertado con tejido de prepucio humano, en el cual las células de tumor M24met de melanoma humano se implantan intradérmicamente. En una modalidad adicional, dicho EC_{50} es menor de 400 nM, menor de 300 nM, menor de 200 nM, menor de 150 nM, menor de 100 nM, menor de 50 nM, menor de 25 nM, o menor de 5 nM. En ciertas modalidades, el EC_{50} es desde 50 nM hasta 500 nM. En otras modalidades, el IC_{50} es desde 25 nM hasta 300 nM. En otras modalidades, el IC_{50} es desde 50 nM hasta 150 nM.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este inhibe la angiogénesis de los vasos humanos en un ratón SCDI injertado con tejido de prepucio humano, en el cual una mezcla de colágeno más células endoteliales macrovasculares humanas se implantan intradérmicamente como se determina por el análisis IHC de ensayo de señal CD-31 por al menos 25% según se compara con una muestra de control. En una modalidad adicional, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este inhibe la angiogénesis de los vasos humanos en un ratón SCDI injertado con tejido de prepucio humano, en el cual el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este inhibe la angiogénesis de los vasos humanos en un ratón SCDI injertado con tejido superior de prepucio humana, en el cual se implanta el colágeno intradérmicamente por al menos 50% según se compara a una muestra de control. En una modalidad adicional, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este inhibe por al menos el 75%, por al menos 80%, por al menos 85%, por al menos 90%, o por al menos 95%, según se compara a una muestra de control.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este compite por la unión al ALK.1 con un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1;

4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este compite de forma cruzada por la unión al ALK.1 como un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este se une al mismo epítopo del ALK.1 como un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este se une al ALK.1 con sustancialmente el mismo K_D como un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende 1.11.1; 1.12.1; 1. 12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este se une al ALK.1 con sustancialmente el mismo K_{dis} como un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1(M29I/D19A);

1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

Un aspecto adicional de la presente invención es un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, y comprende un dominio V_H que es por lo menos 90% idéntico en una secuencia de aminoácido a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104. En una modalidad, dicho dominio V_H es por lo menos 91 %, por lo menos 93%, por lo menos 95%, por lo menos 99%, o lo menos 100% idéntico en una secuencia de aminoácido a cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104.

En una modalidad, el anticuerpo o porción de este tiene por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, y consiste de un dominio V_L que es por lo menos 90% idéntico en una secuencia de aminoácido a cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, o difiere de cualquier SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104 por tener por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora. Por ejemplo, el dominio V_H puede diferir por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 sustituciones de aminoácidos conservadoras de cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104. En una modalidad adicional, puede ocurrir cualquiera de estas sustituciones de aminoácidos conservadoras en las regiones CDR1, CDR2, y/o CDR3.

Un aspecto adicional de la presente invención es un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, y comprende un dominio V_L que es por lo menos 90% idéntico en una secuencia de aminoácido a cualquiera de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127. En una modalidad, dicho dominio V_H es por lo menos 91%, por lo menos 93%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 99%, o lo menos 100% idéntico en una secuencia de aminoácido a cualquiera de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 33; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127.

En una modalidad adicional, el anticuerpo o porción de este tiene por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, y comprenden un dominio V_L que es una cualquiera secuencia de aminoácido de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 33; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127, o difiere de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 33; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127 por tener por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora. Por ejemplo, el dominio V_L puede diferir por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 sustituciones de aminoácidos conservadoras de cualquiera de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 33; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127. En una modalidad adicional, pueden ocurrir cualquiera de tales sustituciones de aminoácidos conservadoras en las regiones CDR1, CDR2, y/o CDR3.

Otro aspecto de la presente invención es un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente en donde los dominios V_H y V_L son cada uno por lo menos 90% idénticos en secuencia de aminoácido a los dominios V_H y V_L, respectivamente, de

uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1. Por ejemplo, los dominios V_H y V_L son cada uno 91%, 93%, 95%, 99%, o 100% idénticos en secuencias de aminoácidos a los dominios V_H y V_L, respectivamente, uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

En otro aspecto de la presente invención es un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno de este que se selecciona del grupo que comprende de: a) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 6 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 8; b) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 10 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 12; c) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 14 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 16; d) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 18 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 20; e) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 22 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 24; f) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 26 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 28; g) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 30 y un dominio V_L como se establece en la

SEQ ID NO: 32; h) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 34 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 36; i) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 38 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 40; j) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 42 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 44; k) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 46 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 48; l) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 50 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 52; m) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 54 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 56; n) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 58 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 60; o) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 62 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 64; p) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 66 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 68; q) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 70 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 72; r) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 74 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 76; s) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H tal como está establecido en la SEQ ID NO: 78 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 80; t) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 82 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 84; u) un anticuerpo o porción de este que comprende

un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 86 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 88; v) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H tal como está establecido en la SEQ ID NO: 90 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 92; w) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 94 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 127; x) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 6 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 127; e y) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 104 y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 8.

En una modalidad adicional, para cualquiera de los anticuerpos o porciones de estos, como se describió anteriormente en los grupos a) a v), los dominios V_H y V_L pueden diferir de las SEQ ID NOs descritas los mismos por al menos un sustitución de aminoácido conservadora. Por ejemplo, los dominios V_H y V_L pueden diferir de las nombradas SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 en sustituciones de aminoácidos conservadoras. En una modalidad adicional, pueden ocurrir cualquiera de estas sustituciones de aminoácidos conservadoras en las regiones CDR1, CDR2, y/o CDR3.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en donde el dominio V_H se selecciona independientemente de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, o una secuencia que difiera de cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, por al menos

una sustitución de aminoácido conservadora, y el dominio V_L se selecciona independientemente de una cualquiera de las SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 33; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127, o una secuencia que difiere de una cualquiera de las SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 33; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127, por al menos una sustitución de aminoácido conservadora. Por ejemplo, los dominios V_H y V_L pueden diferir cada una de las SE Q ID NOs; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 6 2; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, y de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 33; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127, respectivamente, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en donde dicho anticuerpo o porción comprende secuencias V_H CDR1, CDR2 y CDR3 independientemente seleccionadas de la porción de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, respectivamente, encontrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, o una secuencia que difiere de cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, por al menos una sustitución de aminoácido conservadora. Por ejemplo el V_H CDR1, CDR2 y CDR3 puede diferir de los CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; o 104, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en donde dicho anticuerpo o porción comprende secuencias V_L CDR1, CDR2 y CDR3 independientemente seleccionadas de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, respectivamente, encontrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127, o una secuencia que difiere de cualquiera de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127, por al menos una sustitución de aminoácido conservadora. Por ejemplo el V_L CDR1, CDR2 y CDR3 puede diferir de los CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de cualquiera de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 33; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos conservadoras.

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en donde dicho anticuerpo o porción de unión a de antígeno del V_H y V_L CDR1, el V_H y V_L CDR2, y el V_H y V_L CDR3 como se encuentra en una cualquiera de los anticuerpos monoclonales 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las

propiedades funcionales descritas previamente, en donde dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno de este consiste de una cadena pesada que utiliza un gen humano V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3, 15, V_H 3, 33, V_H 4, 61, o V_H 4, 59. En algunas modalidades, la cadena pesada utiliza un gen humano VH 3, 33, un gen humano D 6-19 y un gen humano J_H 3B; un gen humano V_H 4-31, un gen humano D 6-19 y un gen humano J_H 3B; un gen humano V_H 4-31, un gen humano D 3-3 y un gen humano J_H3B; un gen humano V_H 4, 31 y un gen humano J_H3B; un gen humano V_H 4, 59, un gen humano D 6-19 y un gen humano J_H4B; un gen humano V_H 3, 11, un gen humano D 3-22 y un gen humano J_H6B; un gen humano V_H 3, 15, un gen humano D 3-22 y un gen humano J_H4B; un gen humano V_H 4, 31, un gen humano D 5-12 y un gen humano J_H6B; un gen humano V_H 4, 31, un gen humano D 4-23 y un gen humano J_H4B; un gen humano V_H 4, 31, un gen humano D 2-2 y un gen humano J_H5B; un gen humano V_H 4, 31 y un gen humano J_H6B; un gen humano V_H 3, 15, un gen humano D 1-1 y un gen humano J_H4B; un gen humano V_H 3, 11, un gen humano D 6-19 y un gen humano J_H6B; un gen humano V_H 3, 11, un gen humano D 3-10 y un gen humano J_H6B; o un gen humano V_H 3, 11, un gen humano D 6-6 y un gen humano J_H6B.

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en donde dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno de este comprende una cadena liviana que utiliza un gen humano V_K A27, V_K A2, V_K AI, V_K A3, V_K B3, V_K B2, V_K L1 o V_K L2. En algunas modalidades, la cadena liviana utiliza un gen humano V_K L1 y un gen humano J_K 4; un gen humano V_K A27 y un gen humano J_K 5 o un gen humano J_K4; un gen humano V_K B3 y un gen humano J_K 1; un gen humano V_K L2 y un gen humano J_K 3; un gen humano V_K A2 y un gen humano J_K 1; un gen humano V_K A3 y un gen humano J_K 4; un gen

humano V_K A1 y un gen humano J_K 1; un gen humano V_K B2 y un gen humano J_K 4; o un gen humano V_K A2 y un gen humano J_K 1.

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este con por lo menos una de las propiedades funcionales descritas previamente, en donde dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno de este comprende una o más secuencias de aminoácido FR1, FR2, FR3 o FR4 de cadena pesada y/o cadena liviana como se encuentra en una cualquiera de los anticuerpos monoclonales 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en: a) SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4; b) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 102; c) SEQ ID NO: 100 y SEQ ID NO: 4; y d) SEQ ID NO: 100 y SEQ ID NO: 102.

En una modalidad adicional de la presente invención es cualquiera de los anticuerpos descritos previamente que es una molécula IgG, una IgM, una IgE, una IgA, o una IgD, o es derivada de las mismas. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser IgG_1 o IgG_2.

Otra modalidad proporciona cualquiera de los anticuerpo o porciones de unión a antígeno descritos anteriormente que es un fragmento Fab, un fragmento $F(ab)_2$, un fragmento Fv, un fragmento F_v de cadena única, un fragmento V_H de

cadena única, un fragmento V_L de cadena única, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo específico.

En una modalidad adicional es un anticuerpo derivado o porción de unión a antígeno que comprende cualquiera de los anticuerpos o porciones de estos descritos previamente y por lo menos una entidad molecular adicional. Por ejemplo, por lo menos una entidad molecular puede ser otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo específico o un diacuerpo), un agente de detección, una etiqueta, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o porción del anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo estreptavidina o una etiqueta de polihistidina). Por ejemplo, los agentes de detección útiles con los cuales un anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención se pueden derivar incluyen loas compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, 5-dimetilamina-1-cloruro de naftalensulfonilo, fiocoeritrina, fósforos lantanidos, y similares. Un anticuerpo puede ser marcado también con enzimas que son útiles para la detección, tales como la peroxidasa de rábano, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, oxidasa de glucosa. Y similares. En una modalidad adicional los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de estos pueden ser marcados también con biotina, o con un epítopo polipéptido predeterminado reconocido mediante un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de par de cierre de leucina, lugares de unión para los anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, marcas de epítopos), En aún una modalidad adicional de la presente invención, cualquiera de los anticuerpos o porciones de estos se pueden derivadar también con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-ALK-1 o las porciones de unión a antígeno aquí se adhieren a un soporte sólido.

En algunas modalidades, la lisina de terminal C de la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos anti-ALK-1 de la invención se cliva. En varias modalidades de la invención, las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos anti-ALK-1 pueden incluir opcionalmente una secuencia de señal.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de estos como se describió anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, la invención se relaciona con una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de estos como describe aquí. En una modalidad particular, una molécula de ácido nucleico aislada comprende de la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 1, cuya secuencia codifica una cadena pesada. En otra modalidad particular, una molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 3, cuya secuencia codifica una cadena liviana.

En otra modalidad particular una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que comprende un marco de lectura abierta de la secuencia cADN de un clon depositado bajo un número de acceso ATCC PTA-6864. En otra modalidad particular, una molécula de ácido nucleico aislada

comprende un polinucleótido que comprende un marco de lectura abierta de la secuencia cADN de un clon depositado bajo un número de acceso ATCC PTA-6865.

En otra modalidad particular, una molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 95 o 128, cada una de cuyas secuencias codifica una cadena pesada. En otra modalidad particular, una molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 101, cuya secuencia codifica una cadena liviana.

La invención se relaciona adicionalmente a un vector que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aquí descritas, en donde el vector comprende opcionalmente de una secuencia de control de expresión ligada operablemente a la molécula de ácido nucleico.

Otra modalidad proporciona una célula anfitriona que comprende cualquiera de los vectores aquí descritos o que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aquí descritas. La presente invención proporciona también una línea celular aisladas que produce cualquiera de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno como se describe aquí o que produce la cadena pesada o la cadena liviana de cualquiera de dichos anticuerpos o dicha porciones de unión a antígeno.

En otra modalidad, la presente invención se relaciona con un método para la producción de un anticuerpo ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, que comprende cultivar cualquiera de las células anfitrionas o líneas celulares aquí

descritas bajo condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno de este.

La presente invención también se relaciona con un animal transgénico no humano o planta transgénica que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos aquí descritos, en donde el animal transgénico no humano o planta transgénica expresa dicho ácido nucleico.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para aislar un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este que se une al ALK-1, que comprende la etapa de aislar el anticuerpo del animal transgénico no humano o planta transgénica tal como se describe aquí.

En otra modalidad, la invención se relaciona con un hibridoma depositado bajo un número de acceso ATCC de PTA-6808.

La presente invención proporciona también un método para determinar sí una sustancia inhibe la sobre-regulación de un gen objetivo con dirección 3' de ALK-1, Id1, el método comprende en poner en contacto una primera muestra de células que expresan Id1 con la sustancia y determinar sí la expresión Id1 se inhibe, en donde un nivel reducido de expresión Id1 en la primera muestra de células se ponen en contacto con la sustancia cuando se compara con una muestra de control de células es indicativo de que dicha sustancia inhibe la expresión Id1. La presente invención proporciona adicionalmente el método, en donde la sustancia es un anticuerpo que une al dominio extracelular de ALK-1.

La presente invención proporciona también un método para el tratamiento del crecimiento anormal de la célula en un mamífero en necesidad de este, que comprende la etapa de administrar a dicho mamífero cualquiera de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de estos, o cualquiera de las composiciones farmacéuticas, como se describe aquí. La presente invención proporciona adicionalmente un método para el tratamiento del crecimiento anormal de la célula en un mamífero en necesidad de este con un anticuerpo o porción de unión a antígeno de los mismo de este que une al ALK-1 que comprende las etapas de administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas aquí bajo condiciones adecuadas que permiten la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico. En otra modalidad, el método para el tratamiento del crecimiento anormal de las células comprende administrar una cantidad de una o más sustancias seleccionadas de agentes anti-tumor, agentes anti-angiogénesis, inhibidores de transducción de señal, y agentes antiproliferativos, cuyas cantidades son en conjunto efectivas en el tratamiento contra el crecimiento anormal de las células. En modalidades particulares, dicho crecimiento anormal de células es canceroso.

La presente invención proporciona también una proteína ALK-1 de mono cinómologo aislada que tiene una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 93. La presente invención proporciona adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 93. La presente invención proporciona adicionalmente una molécula de ácido nucleico aislada de la SEQ ID NO: 94.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 muestra un ejemplo de datos de unión a epítopo. El anticuerpo 1.12.1(M29I/D19A) fue inyectado durante 10 minutos seguido por una segunda inyección de 10 minutos del anticuerpo 1.12.1(M29I/D19A). Esto define la respuesta máxima para unja inyección de 20 minutos de ese anticuerpo. La respuesta máxima a la inyección de 20 minutos fue determinada similarmente por el anticuerpo 1.27.1. El anticuerpo 1. 12.1(M29I/D19A) fue inyectado durante 10 minutos seguido por el una inyección de 10 minutos del anticuerpo 1.27.1. Si la respuesta total cae entre las respuestas máximas definidas, entonces los dos anticuerpos deben unirse al mismo epítopo. Sí la respuesta total excede la respuesta máxima más alta, entonces los anticuerpos deben unirse a epítopos diferentes. El experimento fue repetido con el orden de las inyecciones invertidas como se describe en el Ejemplo 9.

La Figura 2 muestra la alineación de secuencia de las proteínas humanas y Cyno ALK-1.

La Figura 3 muestra la determinación K_D del anticuerpo 1.21.1 recombinante unido a la superficie celular ALK-1. a) Humano. b) Cyno.

1.12.1 (rWT) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que fue expresada mAb recombinante

1.12.1(M29I/D19A) se refiere a la variante 1.12.1 que se expresa mAB recombinante que contiene dos mutaciones de aminoácidos específicas (la

metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina y el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina).

El 1.12.1(M29I) se refiere a la variante 1.12.1 que se expresa mAB recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica en donde la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina.

El 1.12.1(D 19A) se refiere a la variante 1.12.1 que se expresa mAB recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica, en donde el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina.

La Figura 4 muestra ejemplos de titulaciones ID1 utilizando Ensayo Taqman para las variantes de anticuerpo 1.12.1.

El 1.12.1 se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se aísla del hibridoma.

El 1.12.1(rWT) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante.

El 1. 12.1(M29I/D19A) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAb recombinante que contiene dos mutaciones de aminoácidos específicas (la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina y el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina).

El 1.12.1(M29I) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica en donde la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina.

El 1.12.1(D19A) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica en donde el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina.

La Figura 5 muestra ejemplos de titulaciones ID1 utilizanso un Ensayo Taqman para las variantes de secuencia del anticuerpo 1.12.1 y el derivado Fab.

El 1.12.1 se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se aísla del hibridoma.

El 1.12.1 (rWT) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante.

El 1.12.1(M29I) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica en donde la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina.

El 1.12.1(D19A) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica en donde el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina.

El 1.12.1(M29I/D19A) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante que contiene dos mutaciones de aminoácidos específicas (la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina y el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina).

El Fab 1.12.1(M29I/D19A) se refiere al fragmento de mAb 1.12.1(M29I/D19A) preparado al digerir 1.12.1(M29I/D19) utilizando papaína.

La Figura 6 muestra la internalización ALK-1. (a) Monitor que neutraliza el anticuerpo que permanece en la superficie de la célula. (b) Monitor que permanece en el receptor ALK-1 remanente en la superficie de la célula.

La Figura 7 A muestra la alineación de las secuencias de dominio variable para los anticuerpos anti-ALK-1 de la invención, para las secuencias de línea germinal. Las mutaciones comparadas con la línea germinal están en negrilla. Las secuencias CDR están subrayadas. La Figura 7B muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos predichas de los dominios variables de cadena liviana para los anticuerpos anti-ALK-1 1.12.1, 1.14.1, 1.162.1, 1.31.1, 4.62.1 y 4.72.1 a la secuencia A27 V_K de línea germinal humana. La Figura 7C y 7D muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos predichas de los dominios variables de cadena liviana pesada para los anticuerpos anti-ALK-1 1.12.1, 1.151.1, 1.162.1, 1.8.1, 4.24.1, 4.38.1, .58.1, 4.6.1, 4, 68.1, 4.71.1, 5.13.1 y 5.34.1 a la secuencia V_H 4.31 de línea germinal humana.

La Figura 8 muestra un ejemplo de análisis histológico (H & E Staining) de una sección de la piel humana injertada post-cirugía.

La Figura 9(A) muestra el manchado tricromo de colágeno en un ratón de piel humana.

La Figura 9(B) muestra la detección de vasos humanos en el gel colágeno implantado en un ratón quimérico con prepucio humano. Tex-rojo: vasos humanos. FITC: vasos de ratón. Amarillo: co-manchado.

La Figura 10 muestra una imagen inmunofluorescente de vasos humanos (rojos) y de ratón (verdes) del tumor M24met en el ratón quimérico SCID con prepucio humano.

La Figura 11 muestra la imagen IHC vasos de humanos (marrón) del tumor M24met en el ratón quimérico SCID con prepucio humano.

La Figura 12 muestra las imágenes inmunofluorescentes de los vasos Humanos (rojos) y de ratón (verdes) del control y el anticuerpo 1.12.1 (M29I/D19A) de tumores M24met tratados (10 mg/kg) en el ratón quimérico SCID con prepucio humano.

La Figura 13 muestra la inhibición dependiente de la dosis de crecimiento de vasos de tumor humanos por el anticuerpo 1.12.1(M29I /DI 9 A) en el ratón quimérico SCID con prepucio humano.

La Figura 14 muestra la concentración del plasma de ratón SCID del anticuerpo 1.12.1 (M29I/D19A).

La Figura 15 muestra el EC_{50} estimado para el anticuerpo 1.12.1 (M29I/D 19A) en el modelo quimérico SCID del prepucio M24met. El valor del control en

100% da una concentración de suero artificial de 0.1 nM para propósitos gráficos. Esto no altera el aparente EC_{50}.

Descripción Detallada de la Invención

Definiciones y Técnicas Generales

A menos que se definan de otra manera aquí, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados entendidos comúnmente por aquellos expertos en la técnica. Adicionalmente, a menos que sea de otra forma requerido por el contexto, los términos en singular incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, la nomenclatura utilizada en conexión con, y las técnicas de, cultivo de tejido y célula, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de la proteína y el ácido nucleico e hibridación descritas aquí son aquellas bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica.

Los métodos y técnicas de la presente invención se desarrollan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica tal como se describe en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidos a través de la presente especificación a menos que se indique otra cosa. Ver, por ejemplo, Sambrook, J. & Russell D., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2000); Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,* Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); and

Coligan et al., *Short Protocols in Protein Science,* Wiley, John & Inc. (2003), incorporadas aquí como referencia. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se desarrollan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, tal como son logradas comúnmente en la técnica o como se describe aquí. La nomenclatura utilizada en conexión con, y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica aquí descritas aquí son bien conocidas por, y utilizadas comúnmente en, la técnica.

Los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, serán entendidos por tener los siguientes significados:

Como se utiliza aquí, el término "ALK -1" se refiere a la cinasa-1 similar al receptor de activina de mamífero. El término ALK-1 se propone incluir el ALK.1 recombinante y las formas quiméricas recombinantes de ALK-1, que se pueden preparar mediante métodos de expresión recombinante estándar.

Como se utiliza aquí, el acrónimo "mAb" se refiere a un anticuerpo monoclonal.

Como se utiliza aquí, un anticuerpo que es referido por un número es un anticuerpo monoclonal (mAb) que se obtiene del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 1.12.1 se obtiene del hibridoma 1. 12. 1.

El 1.12.1 se refiere a la variable 1.12.1 mAb que se aísla de la hibridoma.

El 1.12.1 (rWT) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAb recombinante.

El 1.12.1(M29I/D19A) se refiere a la VARIANTE mAb 1.12.1 que se expresa mAb recombinante que contiene dos mutaciones de aminoácidos específicas (la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina y el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina).

El 1.12.1(M291) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica en donde la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina.

El 1.12.1(D19A) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAb recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica en donde el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina.

Como se utiliza aquí, "crecimiento anormal de la célula", a menos que se indique los contrario, se refiere a un crecimiento celular que es independiente de los mecanismos reguladores normales (por ejemplo, pérdida de inhibición de contacto).

Como se utiliza aquí, el término "adyacente" se utiliza para referirse a las secuencias de nucleótidos que se adhieren directamente uno a otro, no tienen nucleótidos intervinientes. A manera de ejemplo, el polinucleótido 5'-AAAAA-3' está adyacente al trinonucleótido 5´-TTT-3´ cuando las dos se conectan así: 5'-

AAAAATTT-3' o 5'-TTTAAAAA-3', pero no cuando los dos están conectados así: 5'-AAAAACTTT-3'.

El término "agente" se utiliza aquí para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos.

Como se utiliza aquí, "aliviar" una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la severidad de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Esto incluye, pero no se limita a, afectar el tamaño, crecimiento y/o masa de un tumor, el grado o progresión de la metástasis, y similar, en un paciente comparado con estos mismos parámetros en el paciente antes de o en la ausencia del método de tratamiento.

Como se utiliza aquí, el acrónimo "Id1" se refiere a un gen objetivo con dirección a 3' específico de ALK-1, el gen Id1, que es muy importante para la angiogénesis. El gen Id1 se ha reportado para controlar la senda de la angiogénesis en ciertos cánceres mediante impedir la producción de una proteína, trombospondina-I (TSP-1), un supresor de la angiogénesis de ocurrencia natural. Por ejemplo, se ha reportado que el gen Id1, que está expresado altamente en los cánceres de melanoma, mama, cabeza y cuello, cerebro cervical, próstata, pancreático y testicular, que resulta en la expresión disminuida de TSP-1 y formación de vasos sanguíneos de tumor incrementados. Volpert, Olga V. et al. "Volpert, Olga V. et al, "Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin- 1, " *Cancer Cell, Dec.* 2002, Vol. 2, pp. 473-483.

Como se utiliza aquí, el término "Smad" se refiere a las proteínas de dominio Smad encontradas en un rango de especies de nemátodos a humanos. Estas proteínas altamente conservadas contienen un dominio MH 1 de terminal N que contacta el ADN, y está separado por una región de enlace pequeña del dominio MH2 de terminal C, la último muestra una similitud sorprendente con los dominios (FHA) asociados a forkhead. Los dominios FHA y Smad (MH2) comparten una estructura común que consiste de un emparedado de once hebras beta en dos láminas con topología de clave Griega. Las proteínas Smad median en la señalización de las citocinas TGF-beta/activina/BMP-2/4 de las cinasas de proteína del receptor Ser/Thr en la superficie del núcleo. Las proteínas Smad caen dentro de tres clases funcionales: las Smad reguladas por receptor (R-Smad), que incluyen Smad1, -2, -3, -5, y -8, cada una de las cuales está involucrada en una senda de señalización específica de ligando; los Smads co-mediadores (co-Smads), que incluyen Smad4, que interactúan con R-Smads para participar en la señalización; y los Smads inhibidores (I-Smads), que incluyen Smad-6 y -7, que bloquean la activación de los R-Smads y los Co-Smads, regulando por lo tanto negativamente las rutas de señalización.

Como se utiliza aquí, el término "TGF-beta" se refiere a los factores-beta de crecimiento de transformación, que constituyen una familia de citocinas multifuncionales (TGF-beta 1-5) que regula el crecimiento y diferenciación de la célula. El factor de crecimiento de transformación (TGF), es uno de muchos factores de crecimiento caracterizados que existen en la naturaleza. Este juega roles cruciales en los ratones "SCID" con inmunodeficiencia combinada severa. Muchas células sintetizan el TGF-beta, y esencialmente todos tienen receptores específicos para este péptido. El TGF-beta regula las acciones de muchos otros factores de crecimiento del péptido y determina una dirección positiva o negativa

de sus efectos. El TGF-beta es una citoquina supresora de tumor con efectos inhibidores de crecimiento en las células epiteliales. El TGF-β puede actuar también como un promotor de tumor al elicitar una transición epitelial a mesenquimal. El TGF-β inactiva varias proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular y así ejerce efectos inhibidores del crecimiento sobre las células epiteliales al causar la detención en la fase G 1 del ciclo celular. La proteína funciona como un homodímero ligado por disulfuro. Esta secuencia está caracterizada por la presencia de varios residuos de cisteína de terminal C, que forman enlaces de disulfuro engranados en una topología similar a nudo. Un arreglo de "nudo de cisteína" similar ha sido notado en las estructuras de algunos inhibidores de enzima y neurotoxinas que se unen a los canales Ca2+ bloqueados por voltaje, aunque difiere la topología precisa. Los genes TGF-beta están expresados diferencialmente, sugiriendo que las varias especies de TGF-beta pueden tener papeles fisiológicos distintos *in vivo*.

Como se utiliza aquí, el término "TGF-beta 1" se relaciona al receptor tipo 1 del factor beta de crecimiento de transformación, que es un péptido de 112 residuos aminoácidos derivados por clivage proteolítico del Terminal C de una proteína precursora. El examen de los niveles de TGF-beta 1 mARN en los tejidos murinos adultos indican que la expresión es predominante en el bazo, pulmón y placenta. Se espera que el TGF-beta 1 juegue papeles importantes en los procesos patológicos.

Como se utiliza aquí, el término "SCID" se refiere a ratones con inmunodeficiencia combinada severa.

Como se utiliza aquí, el término "HUVEC" se refiere a las células endoteliales de vena umbilical humana.

Como se utiliza aquí, los "aminoácidos" se representan por el nombre completo de este, por el código de tres letras correspondiente al mismo, o por el código de una letra correspondiente al mismo, como se indica en la siguiente tabla:

Nombre Completo	Código de Tres Letras	Código de Una Letra
Acido Aspártico	Asp	D
Acido Glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	y
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	He	1
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P

Fenilalanina	Phe	F
Triptofan	Trp	W

Como se utiliza aquí, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver *Immunology--A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), incorporadas aquí como referencia.

Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la cual un residuo aminoácido se sustituye por otro residuo aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* **243**:307-31 (1994).

Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; 2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas; fenilalanina, tirosina, y triptofán; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina, e histidina; 6) cadenas laterales acídicas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen

azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácido conservadora preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina.

Alternativamente, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de verosimilitud-log PAM250 descrita en Gonnet et al., *Science* **256**: 1443-45 (1992), incorporada aquí como referencia. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor negativo en la matriz de verosimilitud de registro PAM250.

En cierta modalidades, las sustituciones de aminoácidos para un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para la formación de complejo de proteína, y (4) confieren o modifican otras propiedades psicoquímicas o funcionales de tales análogos, pero aún retienen la unión específica al ALK-1. Los análogos pueden incluir varias sustituciones a la secuencia de péptido de ocurrencia natural. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples, preferiblemente las sustituciones de aminoácidos conservadoras, pueden ser hechas en la secuencia de origen natural, por ejemplo en la porción del polipéptido fuera del dominio(s) que forman contactos intermoleculares. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser hechas también en el dominio(s) que forman contactos intramoleculares que pueden mejorar la actividad del polipéptido. Una sustitución de aminoácido conservadora no cambiará sustancialmente las características estructurales de la secuencia progenitora; por ejemplo, una sustancia en el aminoácido no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia progenitora, por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe alterar la lámina β

antiparalela que hace que el dominio de unión a i inmunoglobulina ocurra en la secuencia progenitora, o interrumpa otros tipos de estructura secundaria que caracteriza a la secuencia progenitora. En general, la glicina y la prolina no serían utilizadas en una lámina-β anti-paralela. Ejemplos de estructuras polipéptidas secundarias y terciarias reconocidas en la técnica se describen en Proteins. Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); and Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991), incorporadas aquí como referencia.

La similitud de secuencia para los polipéptidos, que se refiere también cono identidad de secuencia, se mide típicamente utilizando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteína compara secuencias similares utilizando mediciones de similitud asignadas a varias sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo las sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, el GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que se pueden utilizar con parámetros por defecto para determinar la tecnología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos relacionados cercanamente, tales como los polipéptidos homólogos de especies diferentes de organismos o entre una proteína tipo silvestre y una muteína de la misma. Ver, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos se pueden comparar también utilizando FASTA que utiliza parámetros por defecto o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. El FASTA2 (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporcionan alineaciones y porcentaje de identidades de secuencias de las regiones de mejor traslapo entre la pregunta y las secuencias de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* **183**:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* **132**: 185-219 (2000)). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la

invención a una base de datos que contenga un gran número de secuencias de organismos diferentes es el programa de computadora BLAST, especialmente blastp o tblastn, utilizando parámetros por defecto. Ver por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* **215**:403-410 (1990=, Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997) incorporadas aquí como referencia.

La longitud de las secuencias de polipéptidos comparada por homología será generalmente de por lo menos aproximadamente 16 residuos aminoácidos, usualmente por lo menos aproximadamente 20 residuos, más usualmente por lo menos aproximadamente 24 residuos, típicamente por lo menos aproximadamente 28 residuos, y preferiblemente más de aproximadamente 35 residuos. Cuando se investiga una base de datos que contiene secuencias de un gran número de organismos, es preferible comparar las secuencias de aminoácidos. El término "análogo" como se utiliza aquí se refiere a los polipéptidos que están comprendidos de un segmento de por lo menos 25 aminoácidos que tiene una identidad sustancial para una porción de una secuencia de aminoácido de origen natural deducida y que tiene por lo menos una de las propiedades del polipéptido de origen natural. Típicamente, los análogos de polipéptido comprenden una sustitución de aminoácido conservadora (o adición o eliminación) con respecto a la secuencia de origen natural. Los análogos típicamente son por lo menos de 20 aminoácidos de largo, preferiblemente por lo menos 50 aminoácidos de largo o más largos, y a menudo pueden ser tanto como un polipéptido de origen natural de longitud completa.

Los análogos de péptido se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como drogas no péptidas con propiedades análogas a las del péptido de plantilla. Estos tipos de compuesto no péptido son denominados "péptidos

65
49

miméticos" o "péptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Drug. Res.* **15**:29 (1986); Veber y Freidinger *TINS* p. 392 (1985); y Evans et al. *J. Med. Chem.* **30**: 1229 (1987), que se incorporna aquí como referencia. Tales compuestos son desarrollados a menudo con la ayuda de modelos moleculares computarizados.

Los péptidos miméticos que son estructuralmente similares a los péptidos útiles terapéuticamente se pueden utilizar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los péptidomiméticos son similares estructuralmente a un polipéptido paradigma (esto es, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero que tiene uno o más enlaces péptidos reemplazados opcionalmente por un enlace seleccionado del grupo que comprende de: $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2 — CH_2-$, — CH=CH- (cis y trans), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, y CH_2 SO, por métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un aminoácido D del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede ser utilizada para generar más péptidos estables. En adición, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden ser generados por métodos bien conocidos en la técnica (Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* **61**:387 (1992), incorporadas aquí como referencia); por ejemplo, por medio del agregado de residuos de cisteína internos capaces de formar puentes intramoleculares de disulfuro que ciclizan el péptido.

Un "anticuerpo" o "inmunoglobulina" intactos (Ig) comprende de por lo menos dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa) y dos cadenas livianas (L) (aproximadamente 25 kDa) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Sólo existen dos tipos de cadena liviana: λ y κ. En los humanos son

similares, pero solamente un tipo está presente en cada anticuerpo. Las cadenas pesadas están clasificadas como mu, delta, gama, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. Ver generalmente, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporadas aquí como referencia en su totalidad y para todos los propósitos). En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-ALK-1 es la subclase IgG2.

Cada cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de cadena pesada consta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta de un dominio de cadena liviana (V_L) y una región constante de cadena liviana. La región constante de cadena liviana está compuesta de un dominio, C_L. Dentro de las cadenas liviana y pesada, las regiones variables y constantes está unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada también se incluye una región "D" de aproximadamente 3 o más aminoácidos. Las regiones V_H y V_L pueden estar subdivididas adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes complementarias" (CDR), entremezcladas con regiones que son más conservadas, denominadas "regiones de estructura" (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, arreglados de término amino a término carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 and 1991)), o Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. **196**:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* **342**:878-883 (1989).

Los dominios variables de cada par de cadenas pesada/liviana (V_H y V_L) forman el lugar de unión que interactúa con un antígeno. Así, un anticuerpo IgG intacto, por ejemplo, tiene dos sitios de unión. Excepto en.los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos lugares de unión son los mismos. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores anfitriones, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema clásico de complemento.

Los anticuerpos deben tener suficiente diversidad de unión antígeno para reconocer cada patógeno posible (muchas regiones V) mientras mantienen la efectividad biológica de sus regiones C (pocas regiones C). Los genes Ig se empalman aleatoriamente junto con segmentos de gen que permiten que muchas regiones V sean utilizadas con una pocas regiones C. Los segmentos de gen que codifican las cadenas Ig H, kappa y lambda se encuentran en tres cromosomas diferentes. Durante el crecimiento celular B, las enzimas recombinasa remueven lo intrones y algunos exones del ADN y empalma los segmentos en genes Ig funcionales.

Los segmentos de gen Ig son arreglados en mamíferos en grupos de exones "variable" (V), "diversidad" (D), "unión" (J), y "constante" (C). Los segmentos V kappa (V_K) que codifican los primeros dos CDR y tres FR de la región V de cadena kappa, más unos pocos residuos de CDR3. Los segmentos J kappa (J_K) codifican el resto de CDR3 y el cuarto FR. El C kappa (C_K) codifica la región de la cadena liviana kappa. La cadena kappa que codifica el ADN humano incluye aproximadamente 40 segmentos funcionales V kappa (VK), cinco segmentos J kappa (JK), y un segmento de gen C kappa (C_K), así como también

algunos segmentos de gen que contienen coclones de parada ("seudogenes"). El ADN de cadena humana lambda (λ) contiene aproximadamente 30 segmentos funcionales V lambda (Vλ) y cuatro conjuntos funcionales de segmentos J lambda (Jλ) y C lambda (Cλ). Un J lambda (Jλ) particular siempre se parea con su correspondiente C lambda (Cλ), a diferencia del J kappa (Jk) que todo parea con el mismo C kappa (Ck). El ADN para la cadena humana H incluye aproximadamente 50 segmentos funcionales V_H, 30 segmentos D_H, y seis segmentos J_H. Los primeros dos CDR y tres FR del dominio variable de cadena pesada se codifican por V_H. El CDR3 está codificado por unos pocos nucleótidos de V_H, todos de D_H, y parte de J_H, mientras que FR4 se codifica por el resto del segmento de gen J_H. También existen segmentos de gen individuales en el ADN para cada dominio de cadena pesada y región de membrana de cada isótopo, arreglados en el orden en que ellos se expresan por las células B.

El término "polipéptido" abarca las proteínas naturales o artificiales, fragmentos de proteína y los análogos de polipéptido de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada, "polipéptido aislado, " o "anticuerpo aislado" es una proteína, polipéptido o anticuerpo que por virtud de su origen o fuente de derivación (1) no se asocia con los componentes asociados naturalmente que la acompañan en su estado natural, (2) está libre de otras proteínas de las misma especie, (3) está expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza. Así, un polipéptido que se sintetiza químicamente o sintetiza en un sistema celular diferente de la célula que lo origina naturalmente será "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína también puede ser hecha sustancialmente libre de sus componentes asociados

naturalmente por medio del aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

Ejemplos de anticuerpos aislados incluyen, sin limitación, un anticuerpo anti-ALK-1 que ha sido purificado por afinidad utilizando ALK-1 y un anticuerpo anti-ALK-1 que ha sido sintetizado por una línea celular in vitro.

Una proteína o polipéptido es "sustancialmente pura, " "sustancialmente homogénea, " o "sustancialmente purificada" cuando por lo menos aproximadamente 60 a 75% de una muestra exhibe especie simples de polipéptido. El polipéptido o proteína puede ser monomérico o multimérico. Un polipéptido o proteína sustancialmente puro puede típicamente comprender de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% p/p de una muestra de proteína, más usualmente de aproximadamente 95%, y preferiblemente puede ser 99% pura. La pureza de la proteína u homogeneidad puede ser indicada por un número de medios conocidos en la técnica, tales como la electroforesis de gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguida por la visualización de una banda de polipéptido sencilla después de manchar el gel con una tintura bien conocida en la técnica. Para ciertos propósitos, una resolución más alta puede ser proporcionada al utilizar HPLC u otro medio bien conocido en la técnica de la purificación.

El término "fragmento polipéptido, " como se utiliza aquí se refiere a un polipéptido que tiene un terminal amino y/o una eliminación de terminal carboxi, pero en donde la secuencia de aminoácido es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural. En algunas modalidades, los fragmentos son por lo menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de largo. En otras

modalidad, los fragmentos son por lo menos 14, por lo menos 20, por lo menos 50, o por lo menos 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de largo.

El término "análogo" o "polipéptido análogo" como se utiliza aquí se refiere a un polipéptido que comprende un segmento que tiene una identidad sustancial con alguna secuencia de aminoácido de referencia y tiene sustancialmente la misma función o actividad como la secuencia aminoácido de referencia. Típicamente, los análogos de polipéptido comprenden una sustitución de aminoácido conservadora (o inserción o eliminación) con respecto a la secuencia de referencia. Los análogos pueden ser de por lo menos 20 o 25 aminoácidos de largo, o pueden ser por lo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de largo, o más largos, y a menudo pueden ser tan largos como los polipéptidos de longitud completa. Algunas modalidades de la invención incluyen fragmentos de polipéptidos o anticuerpos análogos de polipéptidos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 19, 11, 12, 13, 14, 15, 16, o 17 sustituciones de la secuencia de aminoácido de la línea germinal. Los fragmentos o análogos o moléculas de inmunoglobulina se pueden preparar rápidamente por aquellos medianamente expertos en la técnica siguiendo las enseñanzas de esta especificación.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción anticuerpo"), como se utiliza aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, ALK-1 o ECD de ALK-1). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede desarrollar por los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_L, V_H, C_L

y C_H1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H, y C_H1; (iv) un fragmento F_v que consise de los dominios V_L y V_H de un brazo simple de un anticuerpo, ; (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste de un dominio V_H; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento F_v, V_L, V_H, están codificados mediante genes separados, ellos se pueden unir, utilizando métodos recombinantes mediante un ligador sintético que les permita ser hechos como una cadena de proteína simple en la cual las regiones V_L y V_H se parean para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena simple Fv (scFv)); ver por ejemplo, Bird et al. *Science* 242:423- 426 (1988) and Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)). Tales anticuerpos de cadena simple se espera que también estén abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena simple, tales como los diacuerpos también están abarcadas. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los cuales los dominios V_L y V_H están expresados en una cadena polipéptido simple, pero utilizando un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos lugares de unión a antígeno (ver por ejemplo, Holliger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993); Poljak et al. *Structure* 2:1121-1123 (1994)).

Aún más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este puede ser una parte de las moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de unión a antígeno

de este con uno o más de otras proteínas o péptidos. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región de núcleo estreptavidina para hacer la molécula tetramérica scFv (Kipriyanov et al. *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 (1995)) y el uso de un residuo cisteína, un péptico marcador y una marca de polihistidina de terminal C para hacer moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al. *Mol. Immunol.* 31:1047-1058 (1994)). Otros ejemplos incluyen en donde uno o más de los CDR de un anticuerpo se incorporan dentro de una molécula ya sea covalentemente o no covalentemente para hacerla una inmunoadhesina que une específicamente a un antígeno de interés, tal como ALK-1 o ECD de ALK-1. En esas modalidades los CDRs pueden ser incorporados como parte de una cadena polipéptido más grande, que puede estar unida covalentemente a otra cadena polipéptido, o puede ser incorporada de manera no covalente.

Las porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como digestión de papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Más aún, los anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener utilizando técnicas de ADN recombinantes estándar, tal como se describen aquí.

Como se utiliza aquí, el término "anticuerpo humano" significa cualquier anticuerpo en el cual las secuencias de dominio variable y constante son secuencias humanas. El término abarca los anticuerpos con secuencias derivadas de genes humanos, pero que han sido cambiados, por ejemplo para disminuir la posible inmunogenicidad, aumentar la afinidad, eliminar las cisteínas que causan el plegado indeseable, etc. El término abarca también aquellos anticuerpos

producidos de manera recombinante en células no humanas, que pudieran impartir la glicosilación no típica de las células humanas. Estos anticuerpos se pueden preparar en una variedad de formas, tal como se describe más adelante.

Como se utiliza aquí, el término "agente neutralizante, " "un agente inhibidor" o un anticuerpo antagonista significa un anticuerpo que inhibe la senda de señalización ALK-1/TGF-beta-1/Smad1. En una modalidad preferida, el anticuerpo inhibe la senda de señalización ALK-1/TGF-beta-1/Smad1 por al menos aproximadamente 20%, preferiblemente 40%, más preferiblemente 60%, aun más preferible 80%, o aún más preferible 85%. La neutralización o potencial de inhibición de los anticuerpos anti-ALK-1 humanos puede ser determinada, por ejemplo, mediante su capacidad para inhibir la sobre-regulación de un gen objetivo con dirección 3' específico de ALK-1 Id1, como se presenta en el Ejemplo 12; para inhibir la fosforilación de Smad1 determinada mediante Western Blotting utilizando Sistema de formación de Imagen Odyssey a partir de LI-COR Biosciences tal como se presenta en el Ejemplo 13.

El término "anticuerpo quimérico" como se utiliza aquí significa un anticuerpo que comprende regiones de dos o más anticuerpos diferentes. Por ejemplo, uno o más de los CDR de un anticuerpo quimérico se pueden derivar de anticuerpos anti-ALK-1 humanos. En otro ejemplo, todos los CDR se pueden derivar de anticuerpos anti-ALK-1 humano. En otro ejemplo, los CDR de más de un anticuerpo ALK-1 humano se pueden combinar en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender un CDR1 de la cadena liviana de un primer anticuerpo anti-ALK-1 humano, un CDR2 procedente de la cadena liviana de un segundo anticuerpo anti-ALK-1 humano y un CDR3 procedente de la cadena liviana de un tercer anticuerpo anti-ALK-1 humano, y los

CDR de la cadena pesada se pueden derivar de uno o más de otros anticuerpos anti-ALK-1. Adicionalmente, las regiones de estructura pueden ser derivadas de uno de los anticuerpos anti-ALK-1 desde los cuales se toman los CDR o deuno o más de anticuerpos humanos diferentes. Más aún, tal como se discutió previamente aquí, el anticuerpo quimérico incluye un anticuerpo que comprende una porción derivada desde las secuencias de línea germinal de más de una especie.

En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico de la invención es un anticuerpo anti-ALK-1 humanizado. Un anticuerpo anti-ALK-1 humanizado de la invención comprende la secuencia de aminoácido de una o más regiones de estructura y/o la secuencia de aminoácido de por lo menos una porción de la región constante de uno o más de los anticuerpos anti-ALK-1 humanos de la invención y comprende adicionalmente de secuencias derivadas de un anticuerpo anti-ALK-1 no humano, por ejemplo las secuencias CDR.

Como se utiliza aquí, el término "ELISA" se refiere a un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. Este ensayo es bien conocido por aquellos expertos en la técnica. Ejemplos de este ensayo pueden ser encontrados en Vaughan, T. J. et al., *Nature Biotech.* 14:309-314 (1996), así como también en el Ejemplo 2 de la presente solicitud.

El término "resonancia de plasmón de superficie", como se utiliza aquí, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de las alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo utilizando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and

Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, ver Jonsson et al. *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 (1993); Jonsson et al. *J. Biotechniques* 11:620-627; Jonsson et al. *J. Mol. Recognit.* 8:2125-131 (1995); y Jonsson et al. *Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991).

El término "afinidad" se refiere a una medida de la atracción entre un antígeno y un anticuerpo. La atracción intrínseca del anticuerpo por el antígeno se expresa típicamente como la constante de equilibrio de afinidad de unión (K_D) de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la K_D es = 1 nM, preferiblemente = 100 nM. Una constante de afinidad de unión K_D puede ser medida mediante resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo utilizando el sistema BIACORE™ tal como se discute en los Ejemplos 7 y 8.

El término "k_{dir}" se refiere a la constante de régimen de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Una constante de régimen de disociación k_{dir} puede ser medida mediante resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo utilizando el sistema BIOCORE tal como se discute en los Ejemplos 7 y 8.

El término "avidez" se refiere a la resistencia de combinación funcional de un anticuerpo con su antígeno que está basada tanto en la afinidad como en las valencias del anticuerpo. Como se utiliza aquí, este término describe la afinidad incrementada que ocurre como resultado de los múltiples lugares de unión de antígeno sobre una inmunoglobulina.

Como se utiliza aquí, el término "selectividad molecular" se refiere a la afinidad de unión para que un antígeno específico sea mayor que para otros antígenos. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden ser selectivos para el ALK-1 sobre el ALK-2 hasta ALK-7, significando que la afinidad de unión del anticuerpo para ALK-1 es por lo menos 2 veces mayor, por ejemplo 4 veces, 10 veces, o 50 veces, o 100 veces o más, que para ALK-2 hasta ALK-7. Tales afinidades de unión pueden ser medidas utilizando técnicas estándar conocidas por aquellos expertos en la técnica.

El término "epítopo" incluye cualquier proteína determinante capaz de la unión específica a una inmunoglobulina o receptor de célula T u que de otra manera interactúa con una molécula. Los determinantes epitópicos consisten generalmente de agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o carbohidratos o azúcar y tienen generalmente tres características estructurales dimensionales, así como también características de carga específicas. Un epítopo puede ser "lineal" o "conformacional." En un epítopo lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula interactuante (tal como un anticuerpo) ocurren linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácido de la proteína. En un epítopo conformacional, los puntos de interacción ocurren a través de los residuos de aminoácidos en la proteína que están separados entre sí. Una vez que un epítopo deseado en un antígeno es determinado, es posible generar anticuerpos para tal epítopo, por ejemplo, utilizando las técnicas descritas en la presente invención. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos puede elucidar información acerca de epítopos deseables. A partir de esta información, es posible entonces exhibir competitivamente los anticuerpos para la unión al mismo epítopo. Un enfoque para

lograr esto es conducir estudios de competencia cruzada para encontrar los anticuerpos que se unen competitivamente entre sí, por ejemplo, los anticuerpos compiten por la unión al antígeno. Un proceso de alto rendimiento para los anticuerpos "binning" con base a la competencia cruzada se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 03/48731.

Como se utiliza aquí, el término "binning" se refiere a un método para agrupar anticuerpos con base en sus características de unión a antígeno. La asignación de recipientes es algo arbitraría, dependiendo en cuan diferente son los patrones de unión observados para todos los anticuerpos probados. Por lo tanto, los recipientes no siempre se correlacionan con los epítopos determinados por otros medios y no deberían ser usados para definir los epítopos.

El término "compite", como se utiliza aquí con respeto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo o una porción de unión a antígeno de este, compite por la unión al antígeno con un segundo anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, en donde la unión del primer anticuerpo con su epítopo relacionado es disminuido detectablemente en la presencia del segundo anticuerpo comparado con la unión del primer anticuerpo en la ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en donde la unión del segundo anticuerpo a su epítopo también es disminuido detectablemente en la presencia del primer anticuerpo, puede, pero no necesariamente, ser el caso. Esto es, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítopo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítopo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe detectablemente la unión del otro anticuerpo con su epítopo relacionado o ligando, si es el mismo, mayor, o menor grado, los anticuerpos se dice que están en "competencia cruzada" entre sí para la

unión de su(s) epítopo(s) respectivo(s). Ambos anticuerpos de competencia y competencia cruzada se abarcan en la presente la presente invención. Independientemente del mecanismo por medio del cual ocurra la competencia o la competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional, o unión a un epítopo común, o porción de este, y similar), el experto en la técnica apreciará, con base a las enseñanzas aquí proporcionadas, que tales anticuerpos de competición o de competencia cruzada están abarcados y pueden ser útiles para los métodos aquí descritos.

El término "polinucleótido" como se utiliza aquí se refiere a una forma polimérica de los nucleótidos de por lo menos 10 bases de largo, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye las formas monocatenarias y bicatenarias.

El término "polinucleótido aislado" como se utiliza aquí significa un polinucleótido de origen genómico, cADN, o sintético o alguna combinación de estos, que por virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no se asocia con todo o una porción de los polinucleótidos con los cuales el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) se liga operablemente a un polinucleótido al cual no se liga en la naturaleza, o (3) no ocurre en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "nucleótidos de origen natural" como se utiliza aquí incluye los desoxirribonucleótidos y los ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" como se utiliza aquí, incluye los nucleótidos con grupos azúcares modificados o substituidos y similares. El término "enlaces oligonucleótidos" referido aquí incluye los enlaces oligonucleótidos tales como fosforonilotioato, fosforoniloditioato,

fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoaniladato, fosforoamidato, y similares. Ver por ejemplo, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. *Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein et al., *Nucl. Acids Res. 16*:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach,* pp. 87-108 (F. Ecksteina, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Patente U.S. No. 5, 151, 510; Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990), las descripciones de las cuales se incorporan aquí como referencia. Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta para detección, sí se desea.

Las secuencias "ligadas operablemente" incluyen ambas secuencias de control de expresión que son contiguas con el gen de interés y las secuencias de control de expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés.

El término "secuencias de control de expresión" como se utiliza aquí significa las secuencias de polinucleótido que son necesarias para desarrollar la expresión y procesamiento de las secuencias de codificación a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen las secuencias apropiadas de iniciación de trascripción, terminación, promotoras y mejoradoras: señales de procesamiento ARN eficientes tales como las señales de empalme y polidenilación; las secuencias que estabilizan el mARN citoplásmico; las secuencias que mejoran la eficiencia de traducción (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, las secuencias que mejoran la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo anfitrión; en los procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente

promotor, lugar de unión ribosómica, y secuencia de terminación de trascripción; en los eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de trascripción. El término "secuencias de control" se espera que incluya, en un mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes y secuencias de asociado de fusión.

El término "vector", como se utiliza aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido ligado. En algunas modalidades, el vector es un plásmido, es decir, una pieza bicatenaria circular de ADN en la que pueden estar ligados los segmentos de ADN adicionales. En algunas modalidades, el vector es un vector viral, en donde segmentos adicionales ADN puede estar ligados dentro del genoma viral. En algunas modalidades, los vectores son capaces de la réplica autónoma en una célula anfitriona en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómico). En otras modalidades, los vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómico) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona luego de la introducción en la célula anfitriona, y de esta manera son replicadas junto con el genoma anfitrión. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales están ligados operativamente. Tales vectores son referidos aquí como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión").

El término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), como se utiliza aquí, significa una célula en la cual ha sido introducido

un vector de expresión recombinante. Se debe entender que "célula anfitriona recombinante" y "célula anfitriona" no sólo significa la célula sujeto particular sino también la progenie de tal una célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie no puede, de hecho, ser idéntica a una célula progenitora, pero aún están incluidas dentro del alcance del término "célula anfitriona" como se utiliza aquí.

Como se utiliza aquí, el término "línea germinal" se refiere a las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de los genes del anticuerpo y los segmentos de gen según ellos se pasan de los progenitores a los retoños por vía de células germinales. Esta secuencia de línea germinal se distingue de las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos en células B maduras que han sido alteradas por la recombinación y eventos de hipermutación durante el curso de la maduración de la célula B. Un anticuerpo que "utilice" una línea germinal particular tiene una secuencia de aminoácido o nucleótido que se alinea más cercanamente con tal secuencia de nucleótido de línea germinal o con la secuencia de aminoácido que esta especifica. Tales anticuerpos frecuentemente son mutados, comparados con la secuencia de la línea germinal.

El término "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de las secuencias de ácido nucleico significa que los residuos en dos secuencias que son las mismas cuando se alinean para máxima correspondencia. La longitud de la comparación de la identidad de secuencia puede ser sobre una extensión de por lo menos aproximadamente nueve nucleótidos, usualmente por lo menos aproximadamente 18 nucleótidos, más usualmente por lo menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente por lo menos aproximadamente 28

nucleótidos, más típicamente por lo menos aproximadamente 32 nucleótidos, y preferiblemente por lo menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. Hay un número de algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden utilizar para medir la identidad de la secuencia de nucleótido. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótido se pueden comparar utilizando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluyen, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de las secuencias de las regiones del mejor traslapo entre la pregunta y las secuencias de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); incorporadas aquí como referencia). A menos que se especifique de otra forma, se utilizan los parámetros por defecto para un programa o algoritmo en particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de ácido nucleico pueden ser determinadas utilizando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de clasificación) o utilizando Gap con sus parámetros por defecto como se proporciona en la GCG Versión 6.1, incorporada aquí como referencia.

Una referencia a una secuencia de nucleótido abarca su complemento a menos que se especifique de otra forma. Así, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular se debería entender que abarca su hebra no codificante, con su secuencia complementaria.

El término "similitud sustancial" o "similitud de secuencia sustancial, " cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento de este, significa que cuando están alineados óptimamente con inserciones o eliminaciones de nucleótidos

apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra no codificante), hay una identidad de secuencia de nucleótido en por lo menos 85%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95%. 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de nucleótidos, según como se mide mediante cualquier algoritmo de identidad de secuencia bien conocido, tal como FASTA, BLAST, o Gap, como se discutió anteriormente.

El término "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de las secuencias de aminoácidos significa que los residuos en dos secuencias son los mismos cuando se alinean para máxima correspondencia. La longitud de la comparación de la identidad de secuencia puede ser sobre una extensión de por lo menos aproximadamente cinco aminoácidos, usualmente por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos, más usualmente por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos, típicamente por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos, más típicamente por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos, y aún más típicamente aproximadamente 150, 200 o más aminoácidos. Hay un número de algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden utilizar para medir la identidad de la secuencia de aminoácido. Por ejemplo, las secuencias de aminoácido se pueden comparar utilizando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en Wisconsin Package Versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin.

Cuando se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" o "similitud sustancial, " significa que dos secuencias de aminoácidos, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante de los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos gap por defecto tal como se suministran con los programas, que comparten por lo menos 70%, 75%, u 80% de identidad de secuencia,

preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% o 95% de identidad de secuencia, y más preferiblemente, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia. En ciertas modalidades, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren mediante las sustituciones de aminoácidos conservadoras.

El término "secuencia de señal," llamado también péptido de señal, péptido líder, se refiere a un segmento de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos en el terminal N de una proteína que permite que se secrete la proteína (pasa a través de una membrana celular). La secuencia de señal se remueve a medida que se secreta la proteína.

Como se utiliza aquí, los términos "marca" o "marcado" se refieren a la la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En una modalidad, la marca es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radioetiquetado o adherido a un polipéptido de porciones biotiniladas que pueden ser detectadas mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). En otra modalidad, la etiqueta o marcador puede ser terapéutica, por ejemplo un conjugado de droga o toxina. Varios métodos de etiquetado para los polipéptidos y las glicoproteínas son conocidos en la técnica y se pueden utilizar. Ejemplos de etiquetas para los polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}Ina, ^{125}I ^{131}I), etiquetas fluorescente s (por ejemplo, FIAC, ronamina, lantanida fosforosa), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotinilo, epítopos polipéptidos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por

ejemplo, secuencias pares de cremallera de leucina, lugares de unión para los anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, marcas de epítopo), agentes magnéticos, tales como quelatos gadolinio, toxinas tales comotoxina pertussis, taxol, citocalasia B, gramidicina D, bromuro de etidium, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colcicina, doxorubicina, daunorubicina, antracina dihidroxi, diona, mitoxantrona, mitramicina, actinnomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocortidoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de estos. En algunas modalidades, las etiquetas se adhieren por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

El término "primate" se refiere a un mamífero del orden de los primates, que incluye los antropoides y los prosimios, caracterizado por el desarrollo refinado de las manos y pies, un hocico recortado, y un gran cerebro. Los mamíferos del orden Primates incluyen a los humanos, gorilas, monos, y a los prosimios, o primates inferiores.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad del agente terapéutico que se administra que aliviará en algún grado uno o más de los síntomas del trastorno bajo tratamiento. En referencia al tratamiento del cáncer, una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a aquella cantidad que tiene por lo menos uno de los siguientes efectos: reducción del tamaño del tumor; inhibición (esto es, reducir en algún grado, preferiblemente la detención) de la metástasis del tumor, inhibir en algún grado (esto es, reducir en algún grado, preferiblemente la detención) el crecimiento del tumor, y aliviar en algún grado (ó, preferiblemente, eliminar) uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

"Trata", "tratar" y "tratamiento" ser refieren a un método para el alivio o eliminación de un trastorno biológico y/o los síntomas que lo muestran. Con respecto al cáncer, estos términos simplemente significan que la esperanza de vida de un individuo afectado con un cáncer será aumentada o que uno o más síntomas de la enfermedad serán reducidos.

"Contacto" se refiere a llevar un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este de la presente invención y un ALK-1 objetivo, o epítopo de este, en un conjunto de manera tal que el anticuerpo pueda afectar la actividad biológica del ALK-1. Tal "poner en contacto" puede ser logrado "in vitro." es decir en un tubo de ensayo, un plato petri, o similar. En un tubo de ensayo, poner el contacto puede involucrar solamente a un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este y ALK-1 o epítopo de este o puede involucrar a células completas. Las células también se pueden mantener o desarrollar en platos de cultivo de células y poner en contacto con anticuerpos o porciones de unión a antígeno de estos en ese ambiente. En este contexto, la capacidad de un anticuerpo particular o porción de unión a antígeno de este para afectar en trastorno relacionado conALK-1, Es decir, el IC_{50} del anticuerpo, puede ser determinado antes de intentar el uso de un anticuerpo *in vivo* con organismos vivientes más complejos. Para las células fuera del organismo, existen múltiples métodos, y son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, al poner en contacto el ALK-1 con anticuerpos o las porciones de unión a antígeno de estos.

El acrónimo "FACS" se refiere a Selección de Célula Activada por Fluorescencia. El acrónimo FACS y la citometría de flujo se utilizan intercambiablemente. El etiquetado fluorescente permite la investigación de la estructura y la función de las células. La inmunofluoresciencia, la aplicación

utilizada más ampliamente, involucra el manchado de células con anticuerpos conjugados a tintes fluorescentes tales como fluoresceína y ficoeritrina. Este método se utiliza a menudo para etiquetar las moléculas sobre la superficie de la célula, pero los anticuerpos pueden estar dirigidos a objetivos en el citoplasma. En la inmunofluorescencia directa de un anticuerpo, una molécula es directamente conjugada a un tinte fluorescente, y las células son manchadas en una etapa. En la inmunofluoresciencia indirecta, el anticuerpo primario no es etiquetado, y es agregado un segundo anticuerpo conjugado fluorescentemente tal que sea específico para el primer anticuerpo.

Anticuerpos Anti-ALK-1

La invención pertenece a los anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 neutralizados aislados o porciones de unión a antígeno de estos, que se unen al ALK-1 primato, preferiblemente el ECD del ALK-1 primato, más preferiblemente el ECD del ALK-1 humano. En una modalidad preferida, la invención pertenece a los anticuerpos neutralizados aislados que son anticuerpos monoclonales totalmente humanos o las porciones de unión a antígeno de estos. Preferiblemente, los anticuerpos humanos son anticuerpos anti-ALK-1 humanos recombinantes que tienen una afinidad más grande por el ALK-1 que por el ALK-2 hasta el ALK-7. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-ALK-1 humanos se producen al inmunizar un animal transgénico no humano, por ejemplo, un roedor, cuyo genoma comprende genes de inmunoglobulina humanos de manera tal que el animal transgénico produce anticuerpos humanos. Varios aspectos de la invención se relacionan con tales anticuerpos y las porciones de unión a antígeno de estos, y las composiciones farmacéuticas, así como también ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para hacer tales anticuerpos y

porciones de unión a antígeno. Los métodos para usar los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de la presente invención para abrogar la senda de señalización ALK-1/TGF-beta-1/Smad1 o para detectar el ALK-1 ya sea in vitro o *in vivo*, también se abarcan por la invención.

Un anticuerpo anti ALK-1 de la invención puede comprender una cadena liviana kappa humana o lambda humana o una secuencia de aminoácido derivada de la misma. En algunas modalidades que comprenden una cadena liviana kappa, el dominio de variable de cadena liviana (V_L) utiliza un gen humano A27, A2, AI, A3, B3, B2, L1 o L2 V_k. En algunas modalidades, la cadena liviana utiliza un gen V_K L1 humano y un gen J_K 4 humano; un gen V_K A27 humano y un gen humano J_K 5 o un gen J_K 4 humano; gen V_K B3 humano y un gen J_K 1 humano; gen V_K L2 humano y un gen J_K 3 humano; gen V_K A2 humano y un gen J_K 1 humano; gen V_K A3 humano y un gen J_K 4 humano; gen V_K A1 humano y un gen J_K 1 humano; un gen V_K b2 humano y un gen J_K 4 humano; o un gen V_K A2 humano y un gen J_K 1 humano.

En algunas modalidades, el V_L del anticuerpo anti-ALK-1 comprende una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones (adiciones) de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácido V_K de línea germinal. En algunas modalidades, el V_L del anticuerpo anti-ALK-1 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 sustituciones de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácido V_K de línea germinal. En algunas modalidades, una o más sustituciones de la línea germinal está en las regiones CDR de la cadena liviana. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos V_K relacionadas con la línea germinal están en una o más de las mismas posiciones como las sustituciones relacionadas con la línea de germinal encontrada en cualquiera de

una o más del V_L de los anticuerpos proporcionados aquí como se muestra, por ejemplo, en la Figura 7. En algunas modalidades, los cambios aminoácidos están en una o más de las mismas posiciones, pero involucran una sustitución diferente que en el anticuerpo en referencia.

En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos relacionadas con la línea germinal ocurren en una o más de las mismas posiciones como sustituciones de línea germinal en cualquiera de los V_L de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1 pero las sustituciones pueden representar sustituciones de aminoácidos conservadoras en tal(es) posición(es) con relación al aminoácido en el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, sí una posición particular en uno de estos anticuerpos es cambiada con relación a la línea germinal y es glutamato, un aspartato se puede sustituir en esa posición. Similarmente, sí una sustitución se compara con la línea germinal en un ejemplo de anticuerpo es serina, uno puede sustituir de forma conservada treonina por serina en esa posición. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se discuten *supra*.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ALK-1 comprende una cadena liviana de SEQ ID NO: 4. En otras modalidades, la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de la cadena liviana del anticuerpo 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M291); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1.

En algunas modalidades, la cadena liviana del anticuerpo anti-ALK -1 humano comprende la secuencia de aminoácido V_L del anticuerpo 1.12.1(SEQ ID NO: 8); 1.11.1 (SEQ ID NO: 12); 1.13.1 (SEQ ID NO: 16); 1.14.1 (SEQ ID NO: 20); 1.151.1 (SEQ ID NO: 24); 1.162.1 (SEQ ID NO: 28); 1.183.1 (SEQ ID NO: 32); 1.8.1 (SEQ ID NO: 36); 1.9.1 (SEQ ID NO: 40); 4.10.1 (SEQ ID NO: 44); 4.24.1 (SEQ ID NO: 48); 4.38.1(SEQ ID NO: 52); 4.58.1(SEQ ID NO: 56); 4.62.1 (SEQ ID NO: 60); 4.68.1(SEQ ID NO: 64); 4.72.1(SEQ ID NO: 68); 5.13.1(SEQ ID NO: 72); 5.34.1(SEQ ID NO: 76); 5.53.1(SEQ ID NO: 80); 5.56.1(SEQ ID NO: 84); 5.57.1(SEQ ID NO: 88); o 5.59.1(SEQ ID NO: 92), o diha secuencia aminoácido tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácidos no conservadoras. En otras modalidades, la cadena liviana del anticuerpo anti-ALK-1 humano comprende la secuencia de aminoácido V_L del anticuerpo 1.27.1; 1.29.1 o 1.31.1. En algunas modalidades, la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido del inicio del CDR1 hasta el fin de la CDR3 de cualquiera de los anticuerpos anteriores.

En algunas modalidades, la cadena liviana puede comprender las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas independientemente de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena liviana, respectivamente, de dos o más anticuerpos monoclonales seleccionados de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1, o dichas regiones CDR tienen cada una menos de 3 ó menos de 2 sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o un total de tres ó menos sustituciones de aminoácidos no conservadoras.

En ciertas modalidades, la cadena liviana del anticuerpo anti-ALK -1 comprende las secuencias de aminoácidos de la regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana de un anticuerpo seleccionado de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1, ó dichas regiones CDR tienen cada una menos de 3 o menos de 2 sustituciones de aminoácidos conservadoras y /o un total de tres o menos sustituciones aminoácidos no conservadoras.

Con respeto a la cadena pesada, en algunas modalidades el dominio variable (V_H) utiliza un gen humano V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 o V_H 4-59. En algunas modalidades, la secuencia V_H del anticuerpo anti-ALK-1 contiene una o más sustituciones, eliminaciones, inserciones (adiciones) de aminoácidos, colectivamente "mutaciones" relacionadas con la secuencia de aminoácido V_H de línea germinal. En algunas modalidades, el dominio variable de la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones de la secuencia de aminoácido V_H de la línea germinal. En algunas modalidades, la(s) mutación(es) son sustituciones no conservadoras que se comparan con la secuencia aminoácidos de la línea germinal. En algunas modalidades, las mutaciones están en las regiones CDR de la cadena pesada. En algunas modalidades, la cadena pesada utiliza un gen V_H 3-33 humano, un gen V_HD 6-19 humano y un gen J_H 3B humano; un gen V_H4-31 humano, un gen V_HD6-19 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H4-61 humano, un gen V_HD6-19 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H4-31 humano, un gen D3-3 humano y un gen J_H 3B humano; un gen V_H4-31 humano y un gen J_H 3B Humano; un gen

V_H4-59 Humano, un gen D6-19 humano y un gen J_H 4B Humano; un gen V_H3-11 Humano, un gen D3-22 humano y un gen J_H 6B Humano; un gen V_H3-15 Humano, un gen D3-22 humano y un gen J_H 4B Humano; un gen V_H4-31 Humano, un gen D5-12 humano y un gen J_H 6B Humano; un gen V_H4-31 Humano, un gen D4-23 humano y un gen J_H 4B Humano; un gen V_H4-31 Humano, un gen D2-2 humano y un gen J_H 5B Humano; un gen V_H4-31 Humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H3-150 Humano, un gen D1-1 humano y un gen J_H 4B humano; un gen V_H3-11 humano, un gen D6-19 humano y un gen J_H 6B humano; un gen V_H3-11 humano, un gen D3-10 humano y un gen J_H 6B humano; o un gen V_H3-11 humano, un gen D6-6 humano y un gen J_H 6B humano.

En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos están en una o más de las mismas posiciones como las sustituciones desde la línea de germinal en uno o más de la V_H de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1. En otras modalidades, los cambios de aminoácidos están en una o más de las mismas posiciones, pero involucran una sustitución diferente que en el anticuerpo en referencia.

En algunas modalidades, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 2. En otras modalidades, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1;

5.57.1; o 5.59.1. En algunas modalidades, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido V_H del anticuerpo 1.12.1 (SEQ ID NO: 6); 1.11.1 (SEQ ID NO: 10); 1.13.1 (SEQ ID NO: 14); 1.14.1 (SEQ ID NO: 18); 1.151.1 (SEQ ID NO: 22); 1.162.1 (SEQ ID NO: 26); 1.183.1 (SEQ ID NO: 30); 1.8.1 (SEQ ID NO: 34); 1.9.1 (SEQ ID NO: 38); 4.10.1 (SEQ ID NO: 42); 4.24.1 (SEQ ID NO: 46); 4.38.1(SEQ ID NO: 50); 4.58.1(SEQ ID NO: 54); 4.62.1 (SEQ ID NO: 58); 4.68.1(SEQ ID NO: 62); 4.72.1(SEQ ID NO: 66); 5.13.1(SEQ ID NO: 70); 5.34.1(SEQ ID NO: 74); 5.53.1(SEQ ID NO: 78); 5.56.1(SEQ ID NO: 82); 5.57.1(SEQ ID NO: 86); o 5.59.1 (SEQ ID NO: 90), o dicha secuencia de aminoácido V_H tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11 sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácido no conservadoras. En otras modalidades la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido V_H del anticuerpo 1.27.1; 1.29.1 o 1.31.1. En algunas modalidades, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido del inicio del CDR1 hasta el fin de la CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos anteriores.

En algunas modalidades, la cadena pesada comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(r\VT); 1.12.1(M29JjD19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57. 1; o 5.59. 1, o dichas regiones CDR tienen cada una menos de 8, menos de 6, menos de 4, o menos de 3 sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservadoras.

En algunas modalidades, las regiones CDR de cadena pesada se seleccionan independientemente de las regiones CDR de dos o más anticuerpos

seleccionados de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29D19A); 112.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10:1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1. En otra modalidad, el anticuerpo comprende una cadena liviana como se describió anteriormente y una cadena pesada como se discutió anteriormente. En una modalidad adicional, los CDR de cadena liviana y los CDR de cadena pesada son del mismo anticuerpo.

En varias modalidades, los anticuerpos anti-ALK-1 tienen las secuencias de aminoácido de cadena liviana de longitud completa y cadena pesada de longitud completa, las secuencias de aminoácidos V_H y V_L, las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena liviana o la secuencia de aminoácido de cadena pesada desde el inicio del CDR1 hasta el final de la CDR3 y la secuencia de aminoácido de cadena liviana desde el inicio de la CDR1 hasta el final de la CDR3 del anticuerpo anti-ALK-1 se proporciona aquí.

Un tipo de sustitución de aminoácido que se puede hacer es el cambio de una o más cisteínas en el anticuerpo, que pueden ser químicamente reactivas, con otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. En una modalidad, hay una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución puede ser hecha en un CDR o en una región de estructura de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunas modalidades, la cisteína es canónica.

Otro tipo de sustitución de aminoácido que puede ser hecha es al remover los lugares proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Tales lugares pueden ocurrir en un CDR o región de estructura de un dominio variable o en dominio constante

de un anticuerpo. La sustitución de residuos de cisteína y la remoción de los lugares proteolíticos pueden disminuir el riesgo de heterogeneidad en el producto de anticuerpo y así incrementar su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácido es eliminar los pares asparagina -glicina, que forma lugares de desamidación potenciales, al alterar de uno o ambos residuos.

En algunas modalidades, se cliva la lisina del terminal C de la cadena pesada del anticuerpo anti-ALK-1 de la invención. En varias modalidades de la invención, las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos anti-ALK-1 incluyen opcionalmente una secuencia de señal.

En un aspecto, la invención proporciona veinticinco anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 humanos inhibidores y las líneas celulares de hibridomas que los producen. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención son IgG designados como: 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1{M29ID19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1{D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1. En modalidades preferidas, el anticuerpo anti-ALK-1 humano es anticuerpo 1.12.1, 1.12.1(M29I/D19A), 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A), 1.27.1; 1.14.1, 1.162.1, 1.31.1; 4.62.1, 4.68.1, o 4.72.1. Los anticuerpos reconocen los epítopos expuestos en la superficie sobre los antígenos como regiones de secuencia lineal (primaria) o secuencia estructural (secundaria). Se utiliza BIAcore a fin de definir la superficie de energía del epítopo funcional y determinar la exclusividad del epítopo de los anticuerpos anti-ALK-1 ejemplificados por esta invención.

La Tabla 1 lista los identificadores de secuencia (SEQ ID NO:) de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y liviana de longitud completa de las porciones que contienen dominios variables y variantes de anticuerpo 1.12.1 de los anticuerpos anti-ALK-1 de la invención, y las secuencias de aminoácidos correspondientes deducidas.

Tabla 1

	IDENTIFICADORES DE SECUENCIA (SEQ ID NO)							
Anticuerpo	LONGITUD DE CADENA				PORCIÓN QUE CONTIENE DOMINIO V			
	Pesada		Liviana		Pesada		Liviana	
	ADN	PROTEÍNA	ADN	PROTEÍNA	ADN	PROTEÍNA	ADN	PROTEÍNA
1.11.1					9	10	11	12
1.12.1	1	2	3	4	5	6	7	8
(M29I/D19A)								
1.12.1	95	100	101	102	103	104	126	127
1..12.1(rWT)	128	100	101	102	129	104	126	127
1.13.1					13	14	15	16
1.14.1					17	18	19	20
1.151.1					21	22	23	24
1.162.1					25	26	27	28
1.183.1					29	30	31	32
1.8.1					33	34	35	36
1.9.1					37	38	39	40
4.10.1					41	42	43	44
4.24.1					45	46	47	48

4.38.1					49	50	51	52
4.58.1					53	54	55	56
4.62.1					57	58	59	60
4.68.1					61	62	63	64
4.72.1					65	66	67	68
5.13.1					69	70	71	72
5.34.1					73	74	75	76
5.53.1					77	78	79	80
5.56.1					81	82	83	84
5.57.1					85	86	87	88
5.59.1					89	90	91	92

El 1.12.1(M29I/D19A) se refiere al anticuerpo anti-ALK-1 que contiene una mutación de aminoácido simple específica en la cadena pesada en donde la metionina en la posición 29 se reemplaza con isoleucina y una mutación de aminoácido simple específica en la cadena liviana en donde el ácido aspártico en la posición 19 se reemplaza con alanina como se describe en el Ejemplo 4.

El 1.12.1 se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se aísla del hibridoma.

El 1.12.1(rWT) se refiere a la variante mAb 1.12.1. que fue expresada como un mAb recombinante descrito en el Ejemplo 3.

La invención proporciona adicionalmente variables de la cadena pesada y/o liviana de ciertos anticuerpos anti-ALK-1 humanos arriba listados, que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos. Para designar las variantes, la primera letra es el símbolo de una letra para el aminoácido de la

cadena de anticuerpo de origen natural, el número se refiere a la posición del aminoácido (en donde la posición uno es el aminoácido de terminal N del FR1), y la segunda letra es el símbolo de una letra para la variante aminoácido.

En aún modalidades adicionales, la invención incluye los anticuerpos que comprenden secuencias de aminoácidos de dominio variable con más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98% o más del 99% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácido de dominio variable de cualquiera de los anticuerpos anti-ALK-1 humanos arriba listados.

Clases y Subclases de Anticuerpos Anti-ALK-1

Las clases y sub clases de anticuerpos anti-ALK-1 pueden ser determinadas mediante cualquier método conocido en la técnica. En general, las clases y subclases de un anticuerpo pueden ser determinadas utilizando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpo. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente. Las clases y subclases pueden ser determinadas por ELISA, Western Blot así como también otras técnicas. Alternativamente, las clases y subclases pueden ser determinadas al secuenciar toda o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o liviana de los anticuerpos, comparar sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de varias clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinar las clases y subclases de los anticuerpos.

La clase de un anticuerpo anti-ALK-1 obtenido como se describió anteriormente puede ser cambiada con otra. En un aspecto de la invención, una

molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H se aísla utilizando métodos bien conocidos en la técnica de manera tal que no incluya las secuencias de ácido nucleico que codifican C_L o C_H. "Engineering Antibodies" (Kontermann & Dubek, Eds., Springer-Veriag, Berlín (2001)). Las moléculas de ácido nucleico que codifican V_L o V_H son entonces ligadas operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un C_L o C_H, respectivamente, de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto puede ser logrado utilizando un vector o una molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H, como se describió anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-ALK-1 que originalmente es IgM puede ser cambiado de clase a un IgG. Adicionalmente, el cambio de clase se puede utilizar para convertir una subclase IgG a otra, por ejemplo, desde IgG1 a IgG2. Un método preferido para la producción de un anticuerpo de la invención comprenden isotipos deseados que comprenden las etapas de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-ALK-1 y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana de un anticuerpo anti-ALK-1, obtener el dominio variable de la cadena pesada, ligar el dominio variable de la cadena pesada con el dominio constante de una cadena pesada del isotipo deseado, expresar la cadena liviana y la cadena pesada ligada en una célula, y recolectar los anticuerpos anti-ALK-1 con el isotipo deseado.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ALK-1 es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos anti-ALK-1 pueden ser una molécula IgM, una IgM, una IgE, una IgA, o una IgD. En una modalidad preferida, los anticuerpos anti-ALK-1 es una IgG y es una subclase IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En otra modalidad preferida, el anticuerpo es subclase IgG2.

Identificación de los Epítopos ALK-1 Reconocidos Mediante Anticuerpos Anti-ALK-1

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-ALK-1 humano que se une al ALK-1 y compite o compite de manera cruzada con y/o une el mismo epítopo como: (a) un anticuerpo seleccionado de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1; (b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido del dominio V_H en cualquiera de las SEQ. ID. NOS: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90 o 104, (c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácido del dominio V_L en una cualquiera de las SEQ. ID. NOS: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 o 127, (d) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada como se define en (b) y una dominio variable de cadena liviana como se define en (c).

Uno puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítopo o compite en forma cruzada para unirse con un anticuerpo anti-ALK-1 al utilizar métodos conocidos en la técnica. En una modalidad, uno permite que el anticuerpo anti-ALK-1 de la invención se una al ALK-1 bajo condiciones de saturación y luego mida la capacidad del anticuerpo de ensayo para unir a ALK-1. Sí el anticuerpo de ensayo es capaz de aglutinar a ALK-1 al mismo tiempo que el anticuerpo anti-ALK-1 de referencia, entonces el anticuerpo de ensayo se une a un epítopo diferente que el anticuerpo anti-ALK-1 de referencia. Sin embargo, sí el anticuerpo

de ensayo no es capaz de aglutinar a ALK-1 al mismo tiempo, entonces el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítopo, un epítopo de traslapo, o un epítopo que está en proximidad cercana al epítopo unido por el anticuerpo anti-ALK-1 de la invención. Este experimento puede ser efectuado utilizando ELISA, RIA, BIOCORE™, o citometría de flujo. Para probar sí un anticuerpo anti-ALK-1 compite de manera cruzada con otro anticuerpo anti-ALK-1, uno puede usar el método de competencia antes descrito en dos direcciones, es decir, determinar si el anticuerpo conocido bloquea el anticuerpo de ensayo, y viceversa. En una modalidad preferida, el experimento se efectúa utilizando BIOCORE™.

Afinidad de unión de los Anticuerpos Anti-ALK-1 a ALK-1

La afinidad de unión (K_D) y proporción de disociación (K_{dis}) de un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este a ALK-1 pueden ser determinados por métodos conocidos en la técnica. La afinidad de unión puede ser medida mediante ELISA, RIA, citometría de flujo, o resonancia de plasmón de superficie, tal como BIACORE™. La proporción de disociación puede ser medida mediante resonancia de plasmón de superficie. Preferiblemente, la afinidad de unión y la proporción de disociación son medidas mediante resonancia de plasmón de superficie. Más preferiblemente, la afinidad de unión y la proporción de disociación son medidas mediante BIACORE™. Uno puede determinar sí un anticuerpo tiene sustancialmente el misma K_D como un anticuerpo anti-ALK-1 mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos para determinar K_D y el K_{dis} se pueden utilizar durante la etapa de tamizado inicial, así como también durante las etapas de optimización posteriores.

401
86

Inhibición de la Actividad ALK-1 por el Anticuerpo Anti-ALK-1

Los anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 que inhiben la unión ALK-1 pueden ser identificados utilizando un número de ensayos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ALK-1 neutralizados pueden ser identificados por su inhibición de sobre-regulación de un gen objetivo con dirección 3' específico del ALK-1, Id1, como se describe en el Ejemplo 12. Los anticuerpos anti-ALK-1 preferidos tienen un IC_{50} de no más de 500 nM, 300 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM, o 1 nM.

También, uno puede determinar la capacidad de un anticuerpo anti-ALK-1 para inhibir la fosforilización Smad1 determinada mediante Western Blotting utilizando Sistema de Formación de Imagen Infrarroja Odyssey, como se describe en el Ejemplo 13. En varias modalidades, el anticuerpo anti-ALK-1 tiene un IC_{50} en este ensayo de no más de 250 nM, 200 nM, 150 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM, o 1 nM.

Inhibición de Angiogénesis por Anticuerpo anti-ALK-1

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este inhibe la angiogénesis de vasos humano tal como se demostró en un ratón SCID injertado con tejido de prepucio humano, en el cual las células de tumor M24met de melanoma humano se implantan intradérmicamente tal como se determina mediante un análisis IHC de ensayo de señal CD-31 humano mediante un factor de por lo menos 40% cuando se compara con una muestra de control como se describe en el Ejemplo 17 y se muestra en la Tabla 13.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este inhibe la angiogénesis de los vasos humanos tal como se demuestra en un ratón SCID injertado con tejido de prepucio humano, en el cual el colágeno se implanta intradérmicamente como se determina por un análisis IHC de ensayo de señal CD-31 humano mediante un factor de por lo menos 50% cuando se compara con una muestra de control como se describe en el Ejemplo 16 y se muestra en la Tabla 12.

Selectividad de Especies y Molecular

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos anti-ALK-1 demuestran la selectividad de especies y molecular. Siguiendo las enseñanzas de la especificación, uno puede determinar la selectividad de especies y molecular para el anticuerpo anti-ALK-1 utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, uno puede determinar la selectividad de las especies utilizando Western Blot, resonancia de superficie de plasmón, por ejemplo, BIAcore, ELISA, inmunoprecipitación o RIA.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ALK-1 se une al ALK-1 primate con una K_D que es por lo menos dos veces más pequeña que este K_D para el roedor ALK-1. En una modalidad adicional, el K_D para el ALK-1 primate es por lo menos 3 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 100 veces, por lo menos 200 veces, por lo menos 500 veces, o por lo menos 1000 veces más pequeña que su K_D para el ALK -1 roedor según se mide por citometría de flujo.

En otras modalidades, el anticuerpo anti-ALK-1 tiene una selectividad para el ALK-1 en ALK-2 a ALK-7. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ALK-1 no exhibe ninguna unión específica apreciable en cualquier otra proteína diferente al ALK-1. Preferiblemente, el anticuerpo anti-ALK-1 une al ECD de ALK-1 humano.

Métodos de Producción de Anticuerpos y líneas celulares de Producción

Inmunógeno ALK-1

En algunas modalidades, el inmunógeno ALK-1 o antígeno es ALK-1 aislado y/o purificado. En algunas modalidades, el inmunógeno ALK-1 es ALK-1 humano. En modalidades preferidas, el inmunógeno ALK-1 es el ECD de ALK-1 humano. El ALK-1 humano, o porciones antigénicas de este, se puede preparar de acuerdo con métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, o se puede comprar de vendedores comerciales. El aminoácido ALK-1 y las secuencias de nucleótidos son conocidas (ver por ejemplo Acceso de registro Genbank No. L17075). El gen ACVRL1 que codifica un ALK-1 de longitud completa que está disponible comercialmente de Invitrogen Inc., Clon ID IOH21048. Por ejemplo, R&D Systems vende la quimera ALK-1/Fc humana recombinante (Número de Catálogo 370-AL) preparada mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica el ECD de los residuos de aminoácido 1-118 del ALK-1, cuya secuencia se fusiona como una secuencia de ADN que codifica la región F_C del IgG humano por vía de una secuencia de ADN que codifica un ligador polipéptido en una línea celular de mieloma de ratón. La quimera ALK-1/Fc humana madura recombinante es una proteína homodimérica ligada a disulfuro que tiene un Asp 22 en el terminal amino. En adición, el Ejemplo 1 describe la preparación de la proteína ECD His-Tag ALK-1 que se ha utilizado para la generación de hibridomas que producen un

anticuerpo anti-ALK-1 de acuerdo con la presente invención.

En otras modalidades, el antígeno ALK-1 es una célula que expresa o sobreexpresa ALK-1. En otras modalidades, el antígeno ALK-1 es una proteína recombinante expresada a partir de la levadura, células de insecto, bacterias tales como *E. Coli*, u otros recursos mediante tecnología recombinante.

Inmunización

En algunas modalidades, los anticuerpos humanos se producen al inmunizar un animal transgénico no humano que comprende dentro de este algunos genomas o todos de los loci de cadena pesada y cadena liviana de inmunoglobulina humana con un antígeno ALK-1. En una modalidad preferida, el animal no humano es un animal XENOMOUSE®. (Abgenix, Inc., Freemont, CA).

Los ratones XENOMOUSE® son hebras de ratones creadas por ingeniería que comprenden fragmentos grandes de loci de cadena pesada y cadena liviana de inmunoglobulina humana y son deficientes en la producción de anticuerpo de ratón. Ver, por ejemplo, Green et al., Nature Genetics 7:(13-21) (1994) y las Patentes U.S. Nos. 5, 916, 771, 5, 939, 598, 5, 985, 615, 5, 998, 209, 6, 075, 181, 6, 091, 001, 6, 114, 598, 6, 130, 364, 6, 162, 963 y 6, 150, 584. Ver también WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560, y WO 00/037504.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para hacer anticuerpos anti-ALK-1 de animales no ratones, no humanos, al inmunizar animales

transgénicos no humanos que comprende loci de inmunoglobulina humana con un antígeno de ALK-1. Uno puede producir tales animales utilizando los métodos descritos en la Patente U.S. No. 5.994.619, que se incorpora aquí como referencia. La Patente U.S. No. 5.994.619 describe métodos para la producción líneas celulares y células de masas celulares internas (CICM) novedosas, derivadas de cerdos y vacas, y células transgénicas CICM en las cuales se ha insertado ADN heterólogo. Las células transgénicas CICM se pueden utilizar para producir embriones, fetos, y retoños transgénicos clonados. La patente '619 describe también métodos de producción de animales transgénicos que son capaces de transmitir el ADN heterólogo a su progenie. En modalidades preferidas de la invención actual, los animales no humanos son mamíferos, particularmente ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado, caballos o pollos.

Los ratones XENOMOUSE® producen un repertorio humano similar a adulto de anticuerpos completamente humanos y generan anticuerpos humanos específicos s antígeno. En algunas modalidades, los ratones XENOMOUSE® contienen aproximadamente 80% del repertorio de gen V de anticuerpo humano a través de la introducción de fragmentos de configuración de línea germinal de tamaño megabase del loci de cadena pesada humana y del loci de cadena liviana kappa en cromosoma de levadura artificial (YAC). En otras modalidades, los ratones XENOMOUSE® contienen adicionalmente aproximadamente todos los locus de la cadena liviana lambda humana. Ver Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), y WO 98/24893, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia.

En algunas modalidades, los animales no humanos que comprenden genes de inmunoglobulina humanos son animales que tienen un "minilocus" de

107
91 u

inmunoglobulina humana. En el enfoque del minilocus, un locus Ig exógeno es imitado a través de la inclusión de genes individuales del locus Ig. Así, se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, un dominio constante mu, y un segundo dominio constante (preferiblemente un dominio constante gamma) en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe, *inter alia* en las Patentes U.S. Nos. 5, 545, 807, 5, 545, 806, 5, 569, 825, 5, 625, 126, 5, 633, 425, 5, 661, 016, 5, 770, 429, 5, 789, 650, 5, 814, 318, 5, 591, 669, 5, 612, 205, 5, 721, 367, 2, 789, 215, y 5, 643, 762, incorporadas aquí como referencia.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para hacer anticuerpos anti-ALK-1 humanizados. En algunas modalidades, lo animales no humanos se inmunizan con un antígeno ALK-1 tal como se describe a continuación bajo condiciones que permiten la producción del anticuerpo. Las células que producen el anticuerpo se aíslan de los animales, y los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo anti-ALK-1 de interés se aíslan de las células que producen el anticuerpo aislado o de una línea celular inmortalizada producida de tales células. Estos ácidos nucleicos son posteriormente creados por ingeniería utilizando técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica y como se describe adicionalmente adelante para reducir la cantidad de secuencia no humana, es decir, para humanizar el anticuerpo para reducir la respuesta inmune en los humanos.

La inmunización de animales puede ser mediante cualquier método conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los métodos para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos,

ganado y caballos son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Harlow and Lane, supra, y la Patente U.S. No. 5, 994, 619. En una modalidad preferida, el antígeno ALK-1 se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Ejemplos de adyuvantes incluyen el adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger el polipéptido de la dispersión rápida mediante al secuestrar un depósito local, o ellos pueden contener sustancias que estimulan al anfitrión para secretar factores que son quimotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, sí un polipéptido está siendo administrado, el plan de inmunización involucrará uno o más administraciones del polipéptido, se reparte durante varias semanas. El Ejemplo 2 ejemplifica un método para la producción de anticuerpos anti-ALK-1 monoclonales en los ratones XENOMOUSE®.

Producción de Anticuerpos y Líneas Celulares de Producción de Anticuerpos

Después de la inmunización de un animal con un antígeno ALK-1, se pueden obtener anticuerpos y/o células que producen anticuerpos del animal. En algunas modalidades, el suero que contiene el anticuerpo anti-ALK-1 se obtiene del animal por medio del sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede utilizar tal como se obtiene del animal, una fracción de inmunoglobulina se puede obtener del suero, o los anticuerpos anti-ALK-1 se pueden purificar del suero.

En algunas modalidades, las líneas celulares de producción de anticuerpo se preparan a partir de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal es sacrificado y el nódulo linfático y/o las células B esplénicas se inmortalizan por cualesquier medios conocidos en la técnica. Los

métodos para inmortalizar las células incluyen, pero no se limitan a, transfectar las mismas con oncogenes, infectar las mismas con un virus oncogénico y cultivar las mismas bajo condiciones de selección para células inmortalizadas, someter las mismas a compuestos carcinogénicos o mutantes, fusionar las mismas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivar un gen supresor de tumor. Ver, por ejemplo, Harlow and Lane, supra. Sí se utiliza la fusión con células de mieloma, las células de mieloma preferiblemente no secretan polipéptido de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Las células inmortalizadas se tamizan utilizando ALK-1, o una porción de este. En una modalidad preferida, el tamizado inicial se desarrolla utilizando un inmunoensayo ligado por enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo. Un ejemplo de tamizado por ELISA se proporciona en la WO 00/37504, incorporada aquí como referencia.

Las células que producen anticuerpo anti-ALK-1, por ejemplo, hibridomas, se seleccionan, clonan y adicionalmente se tamizan para características deseables, incluyendo crecimiento robusto, alta producción de anticuerpo y características del anticuerpo deseables, como se discute adicionalmente adelante. Los hibridomas pueden ser expandidas *in vivo* en animales singénicos, en animales que carezcan de un sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivo de células *in Vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar, y expandir los hibridomas son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

En una modalidad preferida, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa los genes de inmunoglobulina humanos y las células B esplénicas se fusionan a una línea celular de mieloma de la misma especie del animal no humano. En una modalidad más preferida, el animal inmunizado es un ratón XENOMOUSE® y la línea celular de mieloma es un mieloma de ratón no secretor.

En una modalidad aún más preferida, la línea celular de mieloma es P3-X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection). Ver, por ejemplo, Ejemplo 2.

Así, en una modalidad, la invención proporciona métodos para la producción de una línea celular que produce un anticuerpo humano monoclonal o un fragmento de este dirigido al ALK-1 que comprende (a) inmunizar un animal transgénico no humano aquí descrito con ALK-1, una porción del ALK-1 o una célula o tejido que expresa el ALK-1; (b) permitir que el animal transgénico fije una respuesta inmune a ALK-1; (c) aislar las células que producen el anticuerpo del animal transgénico; (d) inmortalizar las células que producen el anticuerpo; (e) crear poblaciones monoclonales individuales de las células que producen el anticuerpo inmortalizadas; y (f) tamizar las células que producen el anticuerpo inmortalizadas para identificar un anticuerpo dirigido a ALK-1.

En otro aspecto, la invención proporciona una línea celular que produce un anticuerpo anti-ALK-1 humano. En algunas modalidades la línea celular es una línea celular de hibridoma. En algunas modalidades, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió anteriormente. En otras modalidades, los hibridomas se producen en una especia no humana, no ratón tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado y caballos. En otra modalidad, los hibridomas son hibridomas humanos.

En otra modalidad, un animal transgénico se inmuniza con un antígeno ALK-1, células primarias, por ejemplo, las células B de bazo o de sangre periférica, se aíslan de un animal transgénico inmunizado y se identifican las células individuales que producen anticuerpos específicos e identificadas los anticuerpos específicos para el antígeno deseado. El mARN poliadenilado de cada

célula individual se aísla y se desarrolla una reacción de cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), utilizando cebadores codificantes que templan las secuencias de dominio variable, por ejemplo, cebadores degenerados que reconocen la mayoría o todas la regiones FR1 de los genes de dominio variable de las cadenas pesada y liviana humanas y cebadores anticodificantes que templan a las secuencias de unión o regiones constantes. Los cADN de los dominios variables de cadena pesada y liviana luego se clonan y se expresan en cualquier célula anfitriona adecuada, por ejemplo, una célula de mieloma, como anticuerpos quiméricos con regiones constantes de inmunoglobulina respectivas, tales como dominios constantes κ y λ de cadena pesada. Ver Babcook, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 93:7843-48, 1996, incorporada aquí como referencia. Los anticuerpos anti-ALK-1 se pueden luego identificar y asilar como se describe aquí.

En otra modalidad, se pueden utilizar técnicas de despliegue de fágo para proporcionar una colección que contiene un repertorio de anticuerpos con afinidades variantes para el ALK-1. Para la producción de tales repertorios, no es necesario inmortalizar las células B del animal inmunizado. En vez de ello, las células primarias B se pueden utilizar directamente como una fuente de ADN. La mezcla de los cADN obtenidos de la célula B, por ejemplo, derivadaza de bazos, se utiliza para preparar una colección de expresión, por ejemplo, una colección de despliegue de fago transfectada dentro de *E. coli*. Las células resultantes se prueban para inmunoreactividad al ALK-1. Las técnicas para la identificación de los anticuerpos humanos de alta afinidad de tales colecciones están descritas por Griffiths et al., *EMBO J.*, 13:3245-3260 (1994); Nissim et al., *ibid*, pp. 692-698 y por Griffiths et al., *ibid*, 12:725-734, que son incorporadas aquí como referencia. Por último, se identifican clones de la colección que producen afinidad de unión de una magnitud deseada para el antígeno y el ADN que codifica el producto

AXE 46

responsable de tal unión se recupera y manipula para la expresión recombinante estándar. Las colecciones de despliegue de fago también se pueden construir utilizando secuencias de nucleótido previamente manipuladas y tamizar en una forma similar. En general, los cADN que codifican las cadenas pesadas y livianas se suministran independientemente o se ligan para formar análogos Fv para la producción en la colección de fago.

La colección de fago luego se tamiza por los anticuerpos con las afinidades más altas para ALK-1 y el material genético recuperado del clon apropiado. Círculos adicionales de tamizado pueden incrementar la afinidad del anticuerpo aislado original.

Ácidos Nucleicos. Vectores. Células Anfitrionas y Métodos Recombinantes para elaborar Anticuerpos

Ácidos Nucleicos

La presente invención también abarca las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-ALK-1 o los fragmentos de unión de antígeno de estos. En algunas modalidades, diferentes moléculas de ácido nucleico codifican una cadena pesada y una cadena liviana de una inmunoglobulina de anti-ALK-1. En otras modalidades, la misma molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada y una cadena liviana de una inmunoglobulina anti-ALK-1.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena liviana (V_L) utiliza un gen V_K A27, A2, A1, A3, B3, B2, B1 L1 o L2, y un gen humano J_K5, J_K1, J_K3, o J_K4. En algunas modalidades la

molécula de ácido nucleico utiliza un gen humano A27 V_K y un gen humano J_K5. En otras modalidades la molécula de ácido nucleico utiliza un gen humano A2 y un gen humano J_{K1}. En algunas modalidades la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana codifica la secuencia de aminoácido que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 sustituciones de la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) de línea germinal. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de aminoácido V_L que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o 1, 2, o 3 sustituciones no conservadoras comparadas con las secuencias V_K y J_K de línea germinal. Las sustituciones pueden estar en las regiones CDR, las regiones de estructura, o en el dominio constante.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácido V_L que comprende una o más mutaciones comparadas con la secuencia de línea germinal que son idénticas a la mutaciones de la línea germinal encontradas en la V_L de cualquiera de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico codifica por lo menos tres sustituciones de aminoácidos comparadas con la secuencia de línea germinal que son idénticas a la mutaciones de la línea germinal encontradas en la V_L de cualquiera de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1;

1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótido seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NOs: 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91, o 126, que codifica la secuencia de aminoácido de V_L del anticuerpo monoclonal 1.12.1(M29I/D19A); 1. 12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1 o 1.12.1.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido de una de las SEQ ID NOs: 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, o 127. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO: 3 o una porción de esta. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácido de la cadena liviana de uno, dos o todos los tres CDR de dicho anticuerpo. En algunas modalidades, dicha porción codifica una región contigua de CDR1-CDR3 de la cadena liviana de un anticuerpo anti-ALK-1.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácido V_L que es por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácido de cualquiera de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1;

5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1, o la secuencia de aminoácido de la región V_L de la SEC ID NO: 4. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen los ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones altamente rigurosas, tales como aquellas descritas anteriormente, o que son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticas a un ácido nucleico que codifica la secuencia de la región V_L de las SEQ ID NOs: 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, o 126 o a un ácido nucleico que comprende la región V_L de las SEQ ID NO: 4.

En otras modalidades preferidas, la molécula de ácido nucleico codifica el dominio variable de una cadena pesada (VH) que utiliza una secuencia de genes humanos V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 4-61, o V_H 4-59 o una secuencia derivada de las mismas. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico utiliza un gen humano V_H 4-31, un gen DH6-19 y un gen humano JH4B.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácido que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones comparada con la secuencia de aminoácido de línea germinal de los genes humanos V, D, o J. En algunas modalidades, dichas mutaciones están en la región V_H. En algunas modalidades, dichas mutaciones están en las regiones CDR.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia V_H que comprende una o más mutaciones de aminoácidos comparadas la secuencia V_H de línea germinal que son idénticas a las mutaciones de aminoácidos encontradas en la V_H de cualquier anticuerpo monoclonal 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1;

1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica por lo menos tres mutaciones de aminoácidos comparadas con las secuencias de línea germinal que son idénticas con por lo menos tres mutaciones de aminoácidos encontradas en uno de los anticuerpos monoclonales listados anteriormente.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NOs: 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, o 103, que codifica la secuencia de aminoácido del anticuerpo monoclonal 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1 o 1.12.1.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido de una de las SEQ ID NOs: 2; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 74; 78; 82; 86; 90 o 104. En varias modalidades preferidas, la molécula de ácido nucleico comprende por lo menos una porción de la secuencia de nucleótido de las SEQ ID NOs: 1 o 95. En algunas modalidades, dicha porción codifica la región V_H, una región CDR3, todas las tres regiones CDR, o una región contigua que incluye CDR1-CDR3.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia aminoácidos de V_H, que es por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticas a la secuencia de aminoácido de V_H en una

cualquiera de las SEQ ID NOs: 2; 6; 10; 14, ; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 74; 78; 82; 86; 90 o 104. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones altamente rigurosas, tales como aquellas descritas anteriormente, o que son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticas a un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácido de las SEQ ID NOs: 2; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 74; 78; 82; 86; 90 o 104, o a una región V_H de las estas, o a un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido de las SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 95, 103 o 129, o la secuencia de nucleótido que codifica una región V_H de esta.

En otra modalidad, el ácido nucleico codifica una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/DI9A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(DI9A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1, o una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, el ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótido de las SEQ ID NOs: 1 o 95.

Una molécula de ácido nucleico que codifica a la cadena pesada o liviana de un anticuerpo anti-ALK-1 o porciones de este se puede aislar de cualquier fuente natural que produzca tal anticuerpo. En varias modalidades, las moléculas de ácido nucleico se aíslan de una célula B que exprese un anticuerpo anti-ALK-1 aislado de un animal inmunizado con ALK-1 o de una célula inmortalizada derivada de tal una célula B. Los métodos de aislamiento de los ácidos nucleicos

que codifican un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook J. & Russell D.. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2000). El mARN se puede aislar y utilizar para producir cADN para usar en la reacción en cadena polimerasa (PCR), o el clonado del cADN de los genes del anticuerpo. En una modalidad preferida, la molécula de ácido nucleico se aísla de un hibridoma que tiene como uno de sus asociados de fusión a una célula de un animal transgénico no humano, dicha célula produce una inmunoglobulina humana, En una modalidad aún más preferida, la célula que produce inmunoglobulina humana se aísla de un animal XENOMOUSE®. En otra modalidad, la célula que produce la inmunoglobulina humana se aísla de un animal transgénico no humano, no ratón, como se describió anteriormente. En otra modalidad, el ácido nucleico se aísla de un animal no humano, no transgénico. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de un animal no humano, no transgénico pueden ser usadas, por ejemplo, para los anticuerpos humanizados que comprenden una o más secuencias de aminoácidos procedentes de un anticuerpo anti-ALK-1 humano de la presente invención.

En algunas modalidades, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-ALK-1 de la invención puede comprender una secuencia de nucleótido que codifica un dominio V_H de la invención unido en estructura a una secuencia de nucleótido que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. Similarmente, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena liviana de un anticuerpo anti-ALK-1 de la invención puede comprender una secuencia de nucleótido que codifica un dominio V_L de la invención unido en estructura a una secuencia de nucleótido que codifica un dominio constante de cadena liviana de cualquier fuente.

En un aspecto adicional de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesadas (V_H) y liviana (V_L) son "convertidas" a genes de anticuerpo de longitud completa. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H o V_L se convierten en genes de anticuerpo de longitud completa mediante la inserción en un vector de expresión que ya codifica los dominios constantes de cadena pesada (C_H) o constantes de cadena liviana (C_L), respectivamente, de manera tal que el segmento V_H está ligado operativamente al(los) segmento(s) C_H dentro del vector, y/o el segmento V_L está ligado operativamente al segmento C_L dentro del vector. En otra modalidad, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios de V_H y/o V_L se convierten en genes anticuerpo de longitud completa por medio del enlace, por ejemplo, ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica los dominios de V_H y/o V_L a una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio C_H y/o C_L utilizando técnicas biológicas moleculares estándar. Las secuencias de ácido nucleico de los genes de dominio constante de inmunoglobulina de cadenas pesada y liviana humanas son conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y/o livianas de longitud completa luego se pueden expresar a partir de una célula en la cual se han introducido y se ha asilado el anticuerpo anti-ALK-1.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar para expresar recombinantemente grandes cantidades de anticuerpos anti-ALK-1. Las moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar también para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecificos, anticuerpos de cadena simple, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpo, tal como se describe adicionalmente adelante. Sí las moléculas de ácido nucleico se derivan de un

animal no humano no transgénico, las moléculas de ácido nucleico que se pueden utilizar para la humanización del anticuerpo, también se describen adelante.

En otra modalidad, una molécula de ácido nucleico de la invención se utiliza como una sonda o cebador PCR para una secuencia de anticuerpo específica. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede utilizar como una sonda en métodos de diagnóstico o como un cebador PCR para amplificar regiones de ADN que pudieran ser usadas, inter alía, para aislar moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican los dominios variables de los anticuerpos anti-ALK-1. En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos. En algunas modalidades, los oligonucleótidos son de dominios altamente variables de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo de interés. En algunas modalidades, los oligonucleótidos codifican todo o una parte de uno o más de los CDR de los anticuerpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/DI9A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(DI9A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59.1 o las variantes de estos como se describe aquí.

Vectores

La invención proporciona vectores que comprende moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada del anticuerpo anti-ALK-1 de la invención o una porción de unión a antígeno de este. La invención proporciona también vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena liviana de tales anticuerpos o porción de unión a antígeno de estos. La invención proporciona adicionalmente vectores que comprenden moléculas de ácido

nucleico que codifican las proteínas de fusión, los anticuerpos modificados, los fragmentos de anticuerpo, y las sondas de estos.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-ALK-1 de la invención o las porciones de unión a antígeno se expresan mediante la inserción de ADN que codifica las cadenas pesadas y livianas de longitud completa, obtenidas como se describió anteriormente, en vectores de expresión tal que los genes se ligan operativamente a las secuencias de control de expresión necesarias tales como las secuencias de control transcripcional y traslacional. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus asociados adeno (AAV), virus de plantas tales como el virus mosaico de coliflor, virus mosaico de tabaco cósmidos, YACs, episomas derivados de EBV, y similares. El gen de anticuerpo se liga en un vector tal que las secuencias de control transcripcional y trasnacional dentro del vector sirvan sus funciones propuestas para regular la trascripción y traslación de los genes del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se escogen para que sean compatibles con la célula anfitriona de expresión usada. El gen de cadena liviana del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden ser insertados dentro de vectores separados. En una modalidad preferida, ambos genes se insertan dentro del mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan dentro del vector de expresión por métodos estándares (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen del anticuerpo o vector, o ligadura de extremo romo sí no están presentes los lugares de restricción).

Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina funcionalmente completa C_H o C_L, con lugares de restricción apropiados creados por ingeniería de manera tal que cualesquier secuenciasV_H o

V_L se pueden insertar y expresar fácilmente, como se describió anteriormente. En tales vectores, el empalme ocurre usualmente entre el lugar donante de empalme en la región J insertada y el lugar del aceptante de empalme que precede el dominio humano C, y también en las regiones de empalme que ocurren dentro de los exones humanos C_H. La terminación de la poliadenilación y la trascripción ocurre en los lugares cromosomales naturales con dirección a 3' de las regiones de codificación. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula anfitriona. El gen de cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector tal que el péptido de señal se ligada en la estructura al término amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (Es decir, un péptido de señal procedente de una proteína no inmunoglobulina).

En adición a los genes de la cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención transportan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpos en una célula anfitriona. Será apreciado por aquellos expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras puede depender de tales factores como la selección de la célula anfitriona a ser transformada, el nivel deseado de expresión de la proteína, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de la célula anfitriona del mamífero incluye elementos víricos que dirigen altos niveles de proteína de expresión en las células de mamífero, tales como promotoras y/o mejoradores derivados de LTR retrovíricos, citomegalovirus (CMV) (tal como promotor/mejorador de CMV), Virus de simio 40 (SV40) tal como el promotor SV40/mejorador), adenovirus, (por ejemplo, el último promotor adenovirus principal (AdMLP)), polioma y promotores

mamíferos fuertes tales como inmunoglobulina natural, y los promotores actina. Para una descripción adicional de los elementos víricos reguladores, y secuencias de estos, ver por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5, 168, 062, Patente U.S. No. 4, 510, 245 y Patente U.S. No, 4, 968, 615. Los métodos para expresar los anticuerpos en plantas, incluyen una descripción de los promotores y vectores, así como también la transformación de plantas se conoce bien en la técnica. Ver. por ejemplo, la Patente U.S. No. 6, 517, 529, incorporada aquí como referencia. Los métodos para expresar los polipéptidos en las células bacterianas o células de hongos, por ejemplo, células de levadura, son bien conocidas en la técnica.

En adición a los genes de la cadena de anticuerpos y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden transportar secuencias adicionales, tal como las secuencias que regulan la réplica del vector en las células anfitrionas (por ejemplo, orígenes de réplica) y genes de marcador seleccionables. El gen de marcador seleccionable facilita la selección de las células anfitrionas dentro de las cuales ha sido introducido el vector (ver por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 4, 399, 216, 4, 634, 665, y 5, 179, 017, incorporadas aquí como referencia). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a las drogas, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula anfitriona en la cual ha sido introducido del vector. Por ejemplo, los genes de marcador seleccionables incluyen el gen reductasa dihidrofolato (DHFR), (para uso en células anfitrionas dhfr con selección/amplificación de metotrexato), el neo gen (para selección G418), y el gen sintetasa glutamato.

Célula Anfitrionas No Hibridomas y Métodos para la Producción de las Proteínas Recombinantemente

-124
108 1c

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-ALK-1 y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar para la transfección de un mamífero, planta, bacteria o levadura de una célula anfitriona adecuada. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para la introducción de los polinucleótidos en una célula anfitriona. Los métodos para la introducción de los polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen la transfección mediada por dextrano, precipitación de fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, electroporación, encapsulación del (los) polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. En adición, las moléculas de ácido nucleico pueden ser introducidas en células de mamíferos por vectores víricos. Los métodos de transformación de las células son bien conocidos en la técnica. Ver. Por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.912.040, y 4.959.455, incorporadas aquí como referencia). Los métodos para la transformación de células de plantas son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la transformación medida por Agrobacterium, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los métodos de transferir las células de bacteria y de levadura son bien conocidos en la técnica.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como anfitrionas son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, *inter alia*, células de ovario de hámster Chino (CHO), células NSO, células SP2, células HEK-293T, células Freestyle (Invitrogen), células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono verde Africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549,

225
109

y un número de otras células procedente de otras líneas de células. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan mediante la determinación de cuales líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que se pueden utilizar son las líneas celulares de insecto, tales como Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión que codifican los genes de anticuerpo son introducidos dentro de células anfitrionas de mamífero, se producen los anticuerpos por medio del cultivo de las células anfitrionas por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo dentro del medio de cultivo en el cual crecen las células anfitrionas. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos estándares de purificación de proteína. Las células anfitrionas de las plantas incluyen, por ejemplo, Nicotania, Arabidopsis, espirodela, maíz, trigo, papa, etc. Las células anfitrionas bacterianas incluyen *E. coli* y especies *Streptomyces*. Las células anfitrionas de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Adicionalmente, la expresión de los anticuerpos de la invención de las líneas celulares de producción puede ser mejorada utilizando un número de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión de gen de sintetasa glutamina (el sistema GS), en un enfoque común para mejorar la expresión bajo ciertas condiciones. El sistema GS está discutido en su totalidad o en parte en conexión con las Patentes Europeas Nos. 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 y 0 338 841.

Es probable que los anticuerpos expresados mediante las diferentes líneas celulares diferentes o en animales transgénicos tendrán diferente glicosilación

entre los mismos. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico provistas en la presente, o que consistan de la secuencia de aminoácido aquí provista son parte de la presente invención independientemente de glicosilación de los anticuerpos.

Animales y Plantas Transgénicos

Los anticuerpos anti-ALK-1 de la invención también se pueden producir transgénicamente mediante la generación de un mamífero o planta que sea transgénico para las secuencias de cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable del mismo. En conexión con la producción transgénica en los mamíferos, pueden producirse anticuerpos anti-ALK-1 en, y recuperados de, la leche de cabras, vacas, u otros mamíferos. Ver, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5, 827, 690, 5, 765, 687, y 5, 741, 957, incorporadas aquí como referencia. En algunas modalidades, los animales transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana se inmunizan con ALK-1 o una porción inmunogénica de este, como se describió anteriormente. Los métodos para hacer anticuerpos en las plantas están descritos, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 6, 046, 037 y 5, 959, 177, incorporadas aquí como referencia.

En algunas modalidades, los animales o plantas transgénicos se producen mediante la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-ALK-1 de la invención dentro del animal o planta mediante técnicas transgénicas estándares. Ver Hogan y la Patente U.S. No. 6, 417, 429, *supra*. Las células transgénicas utilizadas para hacer el animal transgénico pueden ser células madre embrionarias o células somáticas o un huevo fertilizado. Los organismos transgénicos no humanos pueden ser quiméricos, heterocigotos

no quiméricos, y homocigotos no quiméricos. Ver, por ejemplo, Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000); and Pinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook. Academic Press (1999), todas incorporadas aquí como referencia. En algunas modalidades, los animales transgénicos no humanos tienen una interrupción y reemplazo dirigidos por una construcción orientada que codifica una cadena pesada y/o una cadena liviana de interés. En una modalidad preferida, los animales transgénicos comprenden y expresan moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y livianas que se unen específicamente a ALK-1, preferiblemente el ALK-1 humano. En algunas modalidades, los animales transgénicos comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo modificado tal como un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos anti-ALK-1 pueden ser hechos en cualquier animal transgénico. En una modalidad preferida, los animales no humanos son ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado o caballos. El animal transgénico no humano expresa dichos polipéptidos en la sangre, lecha, orina, saliva, lágrimas, mocos y otros fluidos corporales.

Colecciones de Despliegue de Fago

La invención proporciona un método para producir un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este que comprende en las etapas de sintetizar una colección de anticuerpos humanos en el fago, tamizar la colección con ALK-1 o una porción de unión a antígeno de anticuerpo del mimo, aislar el fago que une al ALK-1, y obtener el anticuerpo a partir de este fago. A manera de ejemplo, un método para la preparación de la colección de anticuerpos para usar en las

técnicas de despliegue de fago comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que comprende un loci de inmunoglobulina humana con ALK-1 o una porción de antígeno de este para crear una respuesta inmune, extractar las células de producción de anticuerpos desde el animal inmunizado; aislar el ARN que codifica las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos de la invención desde la células extractadas, invertir la transcripción de ARN y producir cADN, amplificar el los cADN utilizando cebadores, e insertar el cADN dentro de un vector de despliegue de fago de manera tal que los anticuerpos sean expresados en el fago. Los anticuerpos anti-ALK-1 recombinantes se pueden obtener de esta manera.

Los anticuerpos anti-ALK-1 recombinantes humanos de esta invención pueden ser aislados al tamizar una colección de anticuerpo combinatoria recombinante. Preferiblemente, la colección es una colección de despliegue de fago scFv, generada utilizando cADNs de V_L y V_H humanos preparada a partir de mARN aislado de células B. Los métodos para la preparación y tamizado de tales colecciones son conocidos en la técnica. Los kits para generar las colecciones de despliegue de fago están disponibles comercialmente (por ejemplo, el Sistema de Anticuerpo de Fago Recombinante de Pharmacia, No. de catálogo 27 -9400-01; y el kit de despliegue de fago Stratagene SurfZAprM no. de catálogo 240612). También existen otros métodos y reactivos que se pueden utilizar en la generación y tamizado de las colecciones de despliegue de anticuerpos (ver, por ejemplo, Patente U.S. No. 5, 223, 409; Publicaciones PCT No. WO92/18619, WO 91/17571, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse at el., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.* 12725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992); Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad.* Sci. U.S. 89:35763580 (1992); Garrard et al.,

129
(17

Bio/Technology 9:1373-1377 (1991) Hoogenboom et al., *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991); y Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 88:7978-7982 (1991), todas incorporadas aquí como referencia.

En una modalidad, para aislar y producir anticuerpos anti-ALK-1 humanos con las características deseadas, un anticuerpo anti-ALK-1 humano tal como se describe aquí, se utiliza primero para seleccionar secuencias de cadena pesada y liviana humanas que tengan actividad de unión similar hacia ALK-1, utilizando los métodos de imprimir epítopos descritos en la Publicación PCT No: WO 93/06213, incorporadas aquí como referencia. Las colecciones de anticuerpo utilizadas en este método son preferiblemente colecciones scFv preparadas y tamizadas como se describe en la Publicación PCT No. WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); y Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993), todas incorporadas aquí como referencia. Las colecciones anticuerpo scFv se tamizan utilizando ALK-1 humano como el antígeno.

Una vez que son seleccionados los dominios V_L y V_H humanos, se desarrollan experimentos "mezcle y compare", en los cuales pares diferentes de los segmentos V_L y V_H seleccionados inicialmente se tamizan para la unión de ALK-1 a combinaciones de par V_L y V_H selectas preferidas. Adicionalmente, para mejorar aún más la calidad del anticuerpo, los segmentos de V_L y V_H del(los) par (es) preferido (s) pueden ser mutados aleatoriamente, preferiblemente dentro de la región CDR3 de V_H y/o V_L en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración de afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esto en maduración de afinidad in vitro puede ser logrado mediante la amplificación de los dominios de V_L y V_H utilizando cebadores PCR complementarios al V_H CDR3 o V_L CDR3, respectivamente, cuyos

cebadores han sido "aliñados" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en ciertas posiciones de manera tal que los productos PCR resultantes codifiquen segmentos de V_H y V_L en los cuales se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones CDR de V_H y/o V_L. Estos segmentos de V_L y V_H mutados aleatoriamente pueden ser re-tamizados para la unión a ALK-1.

Luego de tamizar y aislar un anticuerpo anti-ALK-1 de la invención a partir de una colección de despliegue de inmunoglobulina recombinante, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado se pueden recuperar del empaque de muestra (por ejemplo, desde el genoma de fago) y sub-clonar dentro de otros vectores de expresión mediante técnicas de ADN recombinante estándares. Sí se desea, el ácido nucleico puede ser manipulado adicionalmente para crear otras formas de anticuerpo de la invención como se describe adelante. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado por tamizado de una colección combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en células anfitrionas de mamífero, como se describió anteriormente.

Anticuerpos desinmunizados

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo puede ser desinmunizado para reducir su inmunogenocidad utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, las Publicaciones PCT Nos. WO 98/52976 y WO 00/34317 (incorporadas aquí como referencia).

Anticuerpos Mutados

En otra modalidad, las moléculas de ácido nucleico, los vectores y las células anfitrionas se pueden utilizar para hacer anticuerpos anti-ALK-1 mutados. Los anticuerpos pueden ser mutados en los dominios variables de las cadenas pesada y/o liviana, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, una mutación puede ser hecha en una o más de las regiones CDR para aumentar o disminuir el K_D del anticuerpo para el ALK-1, para aumentar o disminuir el K_{dis} o para alterar la especificidad de la unión del anticuerpo. Las técnicas de mutagénesis dirigidas in situ son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., y Ausuibel et al., supra. En otra modalidad, una o más mutaciones son hechas en un residuo aminoácido que se sabe va ser cambiado, comparado a la línea germinal en el anticuerpo monoclonal 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1. Las mutaciones pueden ser hechas en una región CDR o una región de estructura de un dominio variable, o en un dominio constante. En una modalidad preferida, las mutaciones son hechas en un dominio variable. En algunas modalidades, una o más mutaciones son hechas en un residuo aminoácido que se sabe va ser cambiado, comparado con la línea germinal en una región CDR o una región de estructura de un dominio variable de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 73, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92 o 127, o cuya secuencia de ácido nucleico está presentada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 1 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 95, 102 o 126.

En otra modalidad, la región de estructura se muta de manera tal que la(s) región(es) de estructura resultantes tiene(n) la secuencia de aminoácido del gen de línea germinal correspondiente. Una mutación puede ser hecha en una región de estructura o dominio constante para aumentar la vida media del anticuerpo anti-ALK-1. Ver, por ejemplo, la Publicación PCT WO 00/09560, incorporada aquí como referencia. Una mutación en una región de estructura o dominio constante puede ser hecha también para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un lugar para la unión covalente o no covalente con otra molécula, o para alterar aquellas propiedades tales como fijación de complemento, unión FcR y la citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC). De acuerdo con la invención, un anticuerpo simple puede tener mutaciones en cualquiera de los CDRs o regiones de estructura del dominio variable o en el dominio constante.

En algunas modalidades, hay desde 1 hasta 13, incluyendo cualquier número entre estos valores, las mutaciones de aminoácidos en cualquiera de los dominios V_H o V_L del anticuerpo anti-ALK-1 mutado comparado al anticuerpo anti-ALK-1 antes de la mutación. En cualquiera de los anteriores, las mutaciones pueden ocurrir en una o más regiones CDR. Adicionalmente, cualquiera de las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, no hay más de 5, 4, 3, 2, o 1 cambios aminoácidos en los dominios constantes.

Anticuerpos Modificados

En otra modalidad, puede ser hecha una fusión anticuerpo o inmunoadhesina que comprende todo o una porción de un anticuerpo anti-ALK-1

de la invención unido a otro polipéptido. En una modalidad preferida, solamente los dominios variables del anticuerpo anti-ALK-1 están unidos al polipéptido. En otra modalidad preferida, el dominio V_H de un anticuerpo anti-ALK-1 se liga a un primer polipéptido, mientras el dominio V_L del anticuerpo anti-ALK-1 se liga a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de manera tal que los dominios V_H y V_L puedan interactuar entre sí para formar un lugar de unión de antígeno. En otra modalidad preferida, el dominio V_H se separa del dominio V_L mediante un enlace de manera tal que los dominios V_H y V_L puedan interactuar entre sí (ver adelante bajo Anticuerpos de Dominio Simple). El anticuerpo V_L ligado a V_H es ligado entonces al polipéptido de interés. En adición, pueden ser creados anticuerpos de fusión en los cuales dos (o más) anticuerpos de cadena simple están unidos entre sí. Esto es útil sí uno quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una cadena polipéptido simple, o sí uno quiere crear un anticuerpo biespecífico.

Para crear un anticuerpo de cadena simple, (scFv) la fragmentos ADN que codifican V_H y V_L se ligan operativamente a otro fragmento que codifica un enlace flexible, por ejemplo, codificando la secuencia de aminoácido $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, de manera tal que las secuencias V_H y V_L puedan ser expresadas como una proteína contigua de cadena simple, con los dominios V_L y V_H unidos por el enlace flexible. Ver, por ejemplo, Bird et al, *Science* 242:423-426 (1998; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 85:5879-5883 (1998); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente, sí sólo se utilizan un V_H y V_L simple, bivalente sí se utilizan dos V_H y V_L o polivalente sí sólo se usan más de dos V_H y VL. Los anticuerpos biespecíficos o polivalentes se pueden generar al unir específicamente a ALK-1 y a otra molécula.

734
118

En otras modalidades, se pueden preparar otros anticuerpos modificados utilizando anticuerpo anti-ALK-1 que codifica moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, "cuerpos Kappa" (111 et al., *Protein Eng.* 10:949-57 (1997)), "Minicuerpos" (Martin et al., *EMBO J.* 13:5303-9 (1994)), "Diacuerpos (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S. 90:6444-6448 (1993)), o "Janusins' (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991)) y Traunecker et al., *Int. J. Cancer* (Supp1.) 7: 1547 -1556 (1992)) se pueden preparar utilizando técnicas biológicas moleculares estándares siguiendo las enseñanzas de la especificación.

Los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno se pueden producir mediante una variedad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o ligado de de los fragmentos Fab. Ver, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547 -1553 (1992). En adición, los anticuerpos biespecíficos pueden ser formados como "diacuerpos" o "Janusins." En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico une a dos epítopos diferentes de ALK-1. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena pesada y una primera cadena liviana de anticuerpo monoclonal 1. 11. 1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; o 5.59. 1 y una cadena pesada y una cadena liviana adicional. En algunas modalidades, la cadena liviana y la cadena pesada adicional de uno de los anticuerpos monoclonales antes identificados, pero son diferentes de las primeras cadenas pesada y liviana.

En algunas modalidades, los anticuerpos modificados antes descritos se preparan utilizando uno o más de los dominios variables o regiones CDR de un anticuerpo anti-ALK-1 monoclonal humano proporcionado aquí.

Anticuerpos Derivados y Etiquetados

Un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de la invención puede ser derivado o ligado a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o porción de estos son derivados de manera tal que la unión ALK-1 no sea afectado de manera adversa por la derivación o etiquetado. De acuerdo con esto, los anticuerpos o porciones de anticuerpos de la invención se espera que incluyan tanto formas intactas como modificadas de los anticuerpos anti-ALK-1 humanos descritos aquí. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención pueden ser ligados funcionalmente (por medio de acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente farmacéutico, y/o proteína o péptido que pueda mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una marca polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivado es producido mediante el entrecruce de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los entrecruzadores adecuados incluyen aquéllos que son heterobifuncionales, tienen dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-

hidroxisuccinimida) u homobifuncional (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Tales ligadores están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, II.

Otro tipo de anticuerpo derivado es un anticuerpo etiquetado. Los agentes de detección útiles con los cuales un anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención puede ser derivada incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, lantánida fosforosa y similares. Un anticuerpo también puede ser etiquetado con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo es etiquetado con una enzima detectable, el mismo es detectado mediante agregar reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que puede ser discernido. Por ejemplo, cuando el agente peroxidasa de rábano está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado que es detectable. Un anticuerpo también puede ser etiquetado con biotina, y detectado a través de una medición indirecta de la unión avidina o estreptavidina. También, un anticuerpo puede ser etiquetado con un epítopo polipéptido predeterminado reconocido mediante un reportero secundario (por ejemplo, secuencias pares de cremallera leucina, lugares de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, marcas de epítopo). En algunas modalidades, las etiquetas están adheridas a brazos separadores de varias longitudes para reducir la potencial separación estérica.

Un anticuerpo anti-ALK-1 también puede ser derivado con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo etilo o metilo, o un grupo carbohidrato.

127
121

Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la vida media del suero.

Composiciones Farmacéuticas y Administración

Esta invención también se relaciona con una composición farmacéutica para el tratamiento de condiciones asociadas con la angiogénesis incrementada indeseable en un mamífero, que incluye un humano, que comprende una cantidad de un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno del mismo, como se describe aquí, que es efectiva en el tratamiento de tales condiciones, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de la presente invención pueden estar incorporados dentro de las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y anti-fúngicos, agentes isotónicos y de retraso de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también las combinaciones de estos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son los agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como

agentes humectantes o emulsificantes, conservantes o amortiguadores, que mejoran el tiempo de conservación o la efectividad del anticuerpo.

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas, por ejemplo, forma de dosificación líquida, semi-sólida y sólida, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y de infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende en el modo provisto de administración y la aplicación terapéutica. Las Composiciones preferidas típicas están en la forma de soluciones inyectables o infusión, tal como las composiciones similares a aquellas utilizadas para la inmunización pasiva de humanos. El modo preferido de administración es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una modalidad preferida, el anticuerpo se administra por infusión intravenosa o inyección. En otra modalidad preferida, el anticuerpo se administra por medio de inyección intramuscular ó subcutánea. Las formulaciones para inyección pueden estar presentadas en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores de dosis múltiple, con o sin un conservante agregado. Las composiciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, de estabilización y/o de dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógeno estéril, antes de uso.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, micro-emulsión, dispersión, liposoma, u otra

259
127

estructura ordenada adecuada para la alta concentración de la droga. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del anticuerpo anti-ALK-1 en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de los ingredientes antes enumerados, según se requiera, seguido por la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo dentro de un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquéllos antes enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y secado congelado que produce un polvo para el ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente estéril-filtrada. La fluidez apropiada de una solución puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, para el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede ser llevada a cabo mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina. Los anticuerpos o porciones de anticuerpo de la presente invención pueden ser administrados mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/ modo de administración preferida es infusión subcutánea, intramuscular, o intravenosa. Tal como será apreciará por el técnico experto, la ruta/ modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

En ciertas modalidades, las composiciones de anticuerpo de la presente invención se pueden preparar con un portador que protegerá al anticuerpo contra la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo

140
124

implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro micro-encapsulados. Pueden ser usados.Polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son conocidos generalmente por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Sistems J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York 1978, que se incorporadas aquí como referencia.

También pueden ser incorporados compuestos activos adicionales dentro de las composiciones. En ciertas modalidades, un anticuerpo anti-ALK-1 inhibidor de la invención es co-formulado con y/o co-administrado con uno ó más agentes terapéuticos adicionales. Estos agentes incluyen, sin limitación, los anticuerpos que se unen a otros objetivos, agentes anti-tumor, agentes anti-angiogénesis, inhibidores de transducción de señal, agentes anti-proliferativos, agentes quimioterapéuticos, o análogos de péptido que inhiben el anti-ALK-1. Tales terapias de combinación pueden requerir de dosis más bajas del anticuerpo anti-ALK-1 inhibidor así como también de los agentes co-administrados, evitando así las posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diferentes monoterapias.

Como se anotó antes, las composiciones de la presente invención opcionalmente pueden comprender adicionalmente un antioxidante farmacéuticamente aceptable en adición a un agente de quelación. Los antioxidantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, metionina, tiosulfato de sodio, catalasa, y platino. Por ejemplo, la composición puede contener metionina en una concentración que varía de 1mm a aproximadamente 100 mm y en particular, es aproximadamente 27 mm. Por ejemplo, una formulación acuosa

puede ser 10 mg/mL de anticuerpo anti-ALK-1, 20 mM de Histina, pH 5, 5, 84 mg/mL de dihidrato de Trehalosa, 0, 2 mg/mL de Polisorbato 80, 0, 05 mg/mL de EDTA disodio, 0, 1 mg/mL de L-Metionina.

Las composiciones de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificación y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de unión a antígeno pude variar de acuerdo con factores tales como estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción del anticuerpo para obtener una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la cual cualquier efecto tóxico o detrimental del anticuerpo o porción de unión a antígeno es sobrepasado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que una dosis profiláctica se utiliza en los sujetos antes de o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva puede ser menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosificación pueden ser ajustados para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede ser administrado un bolo simple, varias dosis divididas se pueden administrar en el tiempo o la dosis puede ser aumentada o disminuida proporcionalmente según sea indicado por las exigencias de la situación

terapéutica. Es especialmente ventajoso para formular las composiciones parenterales en forma de unidades de dosis para facilidad en la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente diferentes adecuadas como dosificación unitaria para los sujetos mamíferos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para estas formas de unidades de dosificación de la invención se dicta por y es directamente dependiente en (a) las características únicas del anticuerpo anti-ALK-1 o porción de este y el efecto terapéutico o profiláctico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer tal un anticuerpo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Un ejemplo, rangos no limitantes para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de anticuerpo de este de la invención es 0, 025 hasta 50 mg/kg, más preferiblemente 0, 1 hasta 50 mg/kg, más preferiblemente 0, 1-25, 0, 1 a 10, ó 0, 1 hasta 3 mg/kg. En algunas modalidades, una formulación contiene 5 mg/mL, de anticuerpo en un amortiguador de 20 mM de citrato de sodio, pH 5, 5, 140 mM de NaCl, y 0, 2 mg/mL de polisorbato 80. Es de notar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y severidad de la condición a ser aliviada, Debe ser entendido adicionalmente que para cualquier sujeto en particular, se deben ajustar los regímenes de dosificación específicos durante el tiempo acordado con el individuo y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación aquí establecidos solamente son a manera de ejemplo y no se entiende que no son limitantes del alcance o la práctica de la composición reivindicada. Otro aspecto de la presente

invención proporciona kits que consisten de un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de la invención o una composición que comprende tal un anticuerpo o porción. Un kit puede incluir, en adición al anticuerpo o composición, agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit puede incluir también instrucciones para el uso en un método de diagnóstico o terapéutico. En una modalidad preferida, el kit incluye el anticuerpo o una composición que lo contiene y un agente de diagnóstico que se puede utilizar en un método descrito adelante. En otra modalidad preferida, el kit incluye el anticuerpo o una composición que lo contiene y uno o más agentes terapéuticos que se pueden utilizar en un método que se describe adelante.

Métodos de Diagnóstico de Uso

Los anticuerpos anti-ALK-1 o porciones de unión a antígeno de estos se pueden utilizar en métodos de diagnóstico para detectar el ALK-1 en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ALK-1 se pueden utilizar en un inmunoensayo convencional, incluyendo, sin limitación, un ELISA, un RIA, una citometría de flujo, una inmunohistoquímica de tejido, Western blot o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-ALK-1 de la invención se pueden utilizar para detectar el ALK.1 de los humanos. Los anticuerpos anti-ALK-1 se pueden utilizar también para detectar el ALK-1 de otros primates, por ejemplo, mono cynomolgus.

La invención proporciona un método para detectar el ALK -1 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-ALK-1 de la invención y detectar el anticuerpo unido. En una modalidad el anticuerpo anti-ALK-1 es etiquetado directamente con una etiqueta

detectable. En otra modalidad adicional, el anticuerpo anti-ALK-1 (el primer anticuerpo) no es etiquetado y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unir el anticuerpo anti-ALK-1 es etiquetada. Como también se conoce por un experto en la técnica, se selecciona un segundo anticuerpo que sea capaz de unir específicamente las especies y clases particulares del primer anticuerpo. Por ejemplo, sí el anticuerpo anti-ALK-1 es un IgG humano, entonces el anticuerpo secundario puede ser un IgG anti-Humano. Otras moléculas que pueden unir a los anticuerpos incluyen, sin limitación, Proteína A y Proteína G, disponibles comercialmente, por ejemplo, de Pierce Chemical Co.

Las etiquetas adecuadas para el anticuerpo o el anticuerpo secundario han sido discutidas previamente e incluyen varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos.

Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o acetilcolinaestearasa; ejemplos de grupo de complejo protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidita/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de danisilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S o ^{3}H.

En otras modalidades, el ALK-1 puede ser ensayado en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competencia utilizando estándares etiquetados ALK-1 con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-ALK-1 no etiquetado. En este ensayo, la muestra biológica, los estándares etiquetados ALK-

1 y el anticuerpo anti-ALK-1 son combinados y es determinada la cantidad de estándar ALK-1 etiquetado unido al anticuerpo no etiquetado. La cantidad de ALK-1 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar ALK-1 etiquetado se une al anticuerpo anti-ALK-1.

Uno puede usar los inmunoensayos descritos anteriormente para un número de propósitos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ALK-1 se pueden utilizar para detectar el ALK-1 en las células cultivadas. En una modalidad preferida, los anticuerpos anti-ALK-1 se utilizan para determinar la cantidad de ALK-1 producido por las células que han sido tratadas con varios compuestos. Este método se puede utilizar para identificar los compuestos que modulan los niveles de proteína ALK-1. De acuerdo con este método, una muestra de células es tratada con un compuesto de prueba durante un período de tiempo mientras otra muestra es dejada sin tratar. Sí el nivel total de ALK-1 va a ser medido, las células se lisan y el ALK.l es medido utilizando uno de los inmunoensayos antes descritos. El nivel total de ALK-1 en las células tratadas versus las células no tratadas es comparado para determinar el efecto del compuesto de prueba.

Un inmunoensayo preferido para medir los niveles totales de ALK-1 es la citometría de flujo o inmunohistoquímica. Métodos tales como ELISA, RIA, citometría de flujo, Western blot, inmunohistoquímica, etiquetado de la superficie de la célula de las proteínas de membrana integral y la inmunoprecipitación son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane, supra. En adición, los inmunoensayos pueden ser escalados ascendentemente a través de todo el tamizado a fin de probar un gran número de compuestos ya sea para la activación o inhibición de la expresión ALK-1.

Los anticuerpos anti-ALK-1 de la invención se pueden utilizar también para determinar los niveles de ALK-1 en un tejido o en las células derivadas del tejido. En algunas modalidades, el tejido es un tejido enfermo. En algunas modalidades, del método, un tejido o una biopsia de este son extraídos de un paciente. El tejido o biopsia se utiliza entonces en un inmunoensayo para determinar, por ejemplo, los niveles totales de ALK-1 o localización de ALK-1 mediante los métodos discutidos anteriormente

Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar también *in vivo* para identificar tejidos y órganos que expresen ALK-1 Una ventaja de usar anticuerpos anti-ALK-1 humanos de la presente invención es que los mismos se pueden utilizar de forma segura in vivo sin elicitar una respuesta inmune sustancial al anticuerpo después de la administración, anticuerpos no deseados de origen no humano o con anticuerpos humanizados o quiméricos.

El método comprende de las etapas de administrar un anticuerpo anti-ALK1 detectable etiquetado o una composición que lo comprende a un paciente en necesidad de tal una prueba de diagnóstico y someter el paciente a un análisis de imagen para determinar la ubicación de los tejidos que expresan ALK-1. El análisis de imagen es bien conocido en la técnica médica, e incluye sin limitación, análisis de rayos X, formación de imagen de resonancia magnética (MRI) o tomografia computarizada (CT). El anticuerpo puede ser etiquetado con cualquier agente adecuado para la formación de imagen *in vivo*, por ejemplo un agente de contraste, tal como bario, que se puede utilizar para el análisis por rayos X, o un agente magnético de contraste, tal como quelato gadolinio, que se puede utilizar para el MRI o CT. Otros agentes de etiquetado incluyen, sin limitación, radioisótopos, tales como 99Tc. En otra modalidad, el anticuerpo anti-ALK-1 no

estará etiquetado y no formara imagen al administrar un segundo anticuerpo ú otra molécula que sea detectable y que pueda unir el anticuerpo anti-ALK-1. En una modalidad, es obtenida una biopsia del paciente para determinar sí el tejido de interés expresa el ALK-1.

Métodos Terapéuticos de Uso

En otra modalidad, la invención proporciona un método para inhibir la actividad ALK-1 mediante la administración de un anticuerpo anti-ALK-1 a un paciente en necesidad de este. Se pueden utilizar terapéuticamente cualquiera anticuerpos o porciones de unión a antígeno de estos descritos aquí. En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-ALK-1 es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. En otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-ALK-1 es un anticuerpo humano, y el paciente es una paciente humano. Alternativamente, el paciente puede ser un mamífero que exprese ALK-1 con el cual reacciona de manera cruzada el anticuerpo anti-ALK-1. El anticuerpo puede ser administrado a un mamífero no humano que exprese el ALK-1 con el cual el anticuerpo reacciona de manera cruzada (por ejemplo, un mono cynomolgus), para propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Tales modelos animales pueden ser útiles en la evaluación de la eficacia terapéutica de los anticuerpos de esta invención.

En otra modalidad, un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de anticuerpo de este puede ser administrado a un paciente que expresa inapropiadamente altos niveles de ALK-1. El anticuerpo puede ser administrado una vez, pero más preferiblemente se administra múltiples veces. El anticuerpo se puede administrar fe tres veces diarias a una vez cada seis meses o mayor. La administración puede

estar en un programa tal como tres veces al día, dos veces diarias, una vez al día, una vez cada dos día, una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. El anticuerpo puede ser administrado también de manera continua vía una minibomba. El anticuerpo puede ser administrado vía una ruta de mucosa, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, o intratumor. El anticuerpo puede ser administrado una vez, por lo menos dos veces o por lo menos el período de tiempo hasta que la condición sea tratada, aliviada o curada. El anticuerpo generalmente será administrado mientras la condición esté presente. El anticuerpo generalmente será administrado como parte de una composición farmacéutica como se describe supra. La dosificación del anticuerpo estará generalmente en el rango de 0, 1 hasta 100 mg/kg, más preferiblemente 0, 5 hasta 50 mg/kg, más preferiblemente de 1 hasta 20 mg/kg, y aún más preferiblemente 1 hasta 10 mg/kg. La concentración de suero del anticuerpo puede ser medida mediante cualquier método conocido en la técnica.

En una modalidad, el anticuerpo se administra en una formulación como una solución acuosa estéril que tiene un pH que varía de aproximadamente 5, 0 hasta aproximadamente 6, 5 y consiste de aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo, de aproximadamente 1 milimolar hasta aproximadamente 100 milimolar de amortiguador histidina, desde aproximadamente 0, 01 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80, desde aproximadamente 100 milimolar hasta aproximadamente 400 milimolar de trehalosa, y desde aproximadamente 0, 01 milimolar hasta aproximadamente 1, 0 milimolar de dihidrato EDTA disodio.

Está contemplado adicionalmente por la presente invención que cualquiera de las composiciones aquí se pueden administrar a un paciente susceptible de o que sufra de una condición asociada con la angiogénesis incrementada ("una condición angiogénica").

Ejemplos de condiciones angiogénicas que pueden ser tratadas/prevenidas por las composiciones/métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer (tanto sólido como hematológico), degeneración macular relacionada con la edad (ADM), anormalidades de desarrollo (organogénesis), ceguera diabética, endometriosis, neovascularización ocular, soriasis, artritis reumatoide (RA), y decoloraciones de la piel (por ejemplo, hemangioma, nevo flamígeno, o nevo simple).

Por ejemplo, la presente invención se relaciona con métodos para el tratamiento o prevención de condiciones asociadas con la neovascularización ocular utilizando cualquiera de las composiciones/métodos de la presente. Las condiciones asociadas con la neovascularización ocular incluyen, pero no se limitan a, la renopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad ("ARMD"), glaucoma rubeótica, queratitis interstitial, retinopatía del prematuro, retinopatía isquémica (por ejemplo, drepanocito), miopía patológica, histoplasmosis ocular, terigio, coroidopatía punctata interna, y similares.

Tratamiento de crecimiento Célular Anormal

Esta invención también se relaciona con un método para el tratamiento del crecimiento celular anormal en un mamífero, incluyendo un humano, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva

de un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, como se describe aquí, que es efectiva en el tratamiento de crecimiento célular anormal.

En una modalidad de este método, el crecimiento anormal de la célula es cáncer, incluyendo, sin estar limitado a, mesotelioma, hepatobiliaridad (ducto hepática y biliar), un tumor CNS primario o secundario, un tumor cerebral primario o secundario, cáncer del pulmón (NSCLC y SCLC), cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o cuello, melanoma cutánea o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, gastrointestinal (gástrico, colorectal, y duodenal), cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de la cerviz, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkina, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de la próstata, cáncer de testículos, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uretra, carcinoma de célula renal, carcinoma de pelvis renal, neoplasmos del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del CNS, linfoma no Hodgkina, tumores de eje espinal, glioma de tronco cerebral, adenoma de pitituaria, cáncer adrenocortical, cáncer de la vesícula biliar, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, ó una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

En una modalidad preferida de la presente invención, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón (NSCLC y SCLC), cáncer de la cabeza ó cuello, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer

de estómago, cáncer de mama, cáncer del riñón o uretra, carcinoma de la célula renal, carcinoma de la pelvis renal, neoplasmos del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del CNS, linfoma no Hodgkina, tumores de eje espinal, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

En otra modalidad preferida de la presente invención, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón (NSCLC y SCLC), cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

En otra modalidad al de dicho método, dicho crecimiento anormal de la célula es una enfermedad proliferativa benigna, incluyendo, pero sin estar limitada a, soriasis, hipertrofia prostática benigna o restinosis.

Esta invención también se relaciona con un método para el tratamiento de crecimiento celular anormal en un mamífero, que comprende en administrar a dicho mamífero una cantidad de un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, como se describe aquí, que sea efectiva en el tratamiento del crecimiento celular anormal en combinación con un agente anti-tumor seleccionado del grupo que consiste de inhibidores mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, antibióticos de intercalación, inhibidores de factor de crecimiento, inhibidores de ciclo celular, enzimas, inhibidores topoisomerasa, modificadores de respuesta biológica, anticuerpos, citotóxicos, anti-hormonas, y anti-andrógenos.

La invención también se relaciona con una composición farmacéutica para el tratamiento del crecimiento celular anormal en un mamífero, incluyendo un

136

humano, que comprende en una cantidad de un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, como se describe aquí, que sea efectiva en el tratamiento del crecimiento celular anormal en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable y un agente anti-tumor seleccionado del grupo que comprende inhibidores mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, antibióticos de intercalación, inhibidores de factor de crecimiento, inhibidores de ciclo celular, enzimas, inhibidores topoisomerasa, modificadores de respuesta biológica, anticuerpos, citotóxicos, anti-hormonas, estatinas, y anti-andrógenos.

La invención también se relaciona con un método para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, como se describe aquí en combinación con un agente anti-tumor seleccionado del grupo que consiste de agentes anti-proliferativos, inhibidores de cinasa, inhibidores de angiogénesis, inhibidores de factor de crecimiento, inhibidores cox-I, inhibidores cox-II, inhibidores mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, antibióticos de intercalación, inhibidores de factor de crecimiento, radiación, inhibidores de ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de respuesta biológica, anticuerpos, citotóxicos, anti-hormonas, estatinas, y anti-andrógenos.

En una modalidad de la presente invención, el agente anti-tumor usado en conjunto con un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, y las composiciones farmacéuticas aquí descritas, es un agente anti-angiogénesis, inhibidor de cinasa, inhibidor pan cinasa o inhibidor de factor de crecimiento. Los inhibidores pan cinasa preferidos incluyen Stutent (Pfizer Inc., SU-11248) descrito en la Patente U.S. No. 6.573.293 (Pfizer, Inc., NY, E.U.A.).+}

Los agentes anti-angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, los siguientes agentes, tales como inhibidor EGF, inhibidores EGFR, inhibidores VEGF, inhibidores VEGFR, inhibidores TIE2, inhibidores IGF1R, inhibidores COX-II (ciclooxigenasa II) inhibidores MMP-2 (matriz-metaloprotienasa 2), e inhibidores MMP-9 (matriz metaloprotienasa 9). Los inhibidores VEGF preferidos incluyen, por ejemplo, Avastina (bevacizumab), un anticuerpo monoclonal anti-VEGF de Genentech, Inc. de South San Francisco, California.

Los Inhibidores VEGF adicionales incluyen CP-547.632 (Pfizer Inc., HY, E.U.A.), Axitinib Pfizer Inc., ; AG-013736), ZD-6474 (Astra-Zeneca), AEE788 (Novartis), AZD-2171), trampa VEGF Regeneron/ Aventis), Vatalanib (conocido también como PTK-787, ZK-222584; N ovarti s & Schering AG), Macugen (pegaptanib octasodio, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Golead/Eyetech), IM862 (Cytran Inc. de Kirkland, Washington, U.S.A.); y angiozima, una ribozima sintética de Ribozyme (Boulder, Colorado) y Chiron (Emeryville, California) y combinaciones de estos. Los inhibidores VEGF útiles en la práctica de la presente invención se describen en la patente U.S. No. 6, 534, 524 y 6, 235, 764 las cuales se incorporan en su totalidad para todos sus propósitos. Los inhibidores VEGF preferidos particularmente incluyen CP547, 632, AG13736, Vatalanib, Maculen, y combinaciones de estos.

Los Inhibidores VEGF adicionales están descritos en, por ejemplo, la WO 99/24440 (publicada el 20 de Mayo de 1999), la Solicitud Internacional PCT PCT/IB99/00797 (presentada el 3 de Mayo de 1999), la WO 95/21613 (publicada el 17 de Agosto de 1995), la WO 99/61422 (publicada el 2 de Diciembre de 1999), la Patente U.S. No. 6.634.524 (descrita AG 13736), la Patente U.S. No. 5.834.504

(emitida el 10 de Noviembre de 1998), la WO 98/50356 (publicada el 12 de Noviembre de 1998), la Patente U.S. No. 5.883.113 (emitida el 16 de Marzo de 1999), la Patente U.S. No. 5.883020 (emitida el 23 de Marzo de 1999), la Patente U.S. No. 5.792.783 (emitida el 11 de Agosto de 1998), la Patente U.S. No. 6.653.308 (emitida el 25 de Noviembre de 2003), la WO 99/10349 (publicada el 4 de Marzo de 1999), la WO 97/32856 (publicada el 12 de Septiembre de 1997), la WO 97/22596 (publicada el 26 de Junio de 1997), la WO 98/54093 (publicada el 8 de Abril de 1999), y la WO 98/02437 (publicada el 22 de Enero de 1998), todas las cuales están incorporadas aquí como referencia en su totalidad.

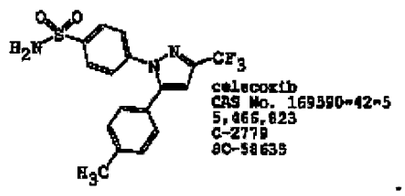
Otros agentes anti-proliferativos que se pueden utilizar con los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de estos, de la presente invención, incluyen los inhibidores de la proteína transferasa de enzima famesilo y los inhibidores del receptor de tirosina cinasa PDGFr, incluyendo los compuestos descritos y reivindicados en las siguientes solicitudes de Patente U.S. Nos.: 09/221946 (presentada el 28 de Diciembre de 1998); 09/454058 (presentada el 2 de Diciembre de 1999); 09/501163 (presentada el 19 de Febrero de 2000); 09/539930 (presentada el 31 de Marzo de 2000); 09/202796 (presentada el 22 de Mayo de 1997); 09/384339 (presentada el 26 de Agosto de 1999); 09/383755 (presentada Agosto 26 1999) y los compuestos descritos y reivindicados en las siguientes solicitudes de patente provisional de los Estados Unidos: 60/168207 (presenta en Noviembre 30 de 1999); 60/170119 (presentada Diciembre 10, 199); 60/177718 (presentada Enero 21, 200); 60/168217 (presentada en Noviembre 30, 1999); y 60/200834 (presentada el 1 de Mayo de 2000). Cada una de las anteriores solicitudes de patente y las solicitudes de patente provisional están incorporadas aquí como referencia en su totalidad.

Para inhibidores PDGRr adicionales, ver la WO 01/40207, publicada el 7 de Julio de 2001 y la W02004/020431, publicada el 11 de Marzo de 2004, los contenidos de los cuales están incorporadas en su totalidad para todos los propósitos. Los inhibidores PDGRr preferidos incluyen el CP-868.596 de Pfizer y las sales farmacéuticamente aceptables de este.

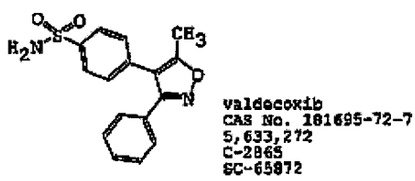
Los inhibidores GARF preferidos incluyen el AG-2037 de Pfizer (pelitrexol y sus sales farmacéuticamente aceptables). Los inhibidores GARF útiles en la práctica de la presente invención se describen en la Patente U.S. No. 5.608.082 que se incorpora en su totalidad, para todos los propósitos.

Los Ejemplos de inhibidores COX-II que se pueden utilizar en conjunto con un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, como se describe aquí, y las composiciones farmacéuticas aquí descritas incluyen CELEBREX™ (celecoxib), parecoxib, dracoxib, ABT-963, MK-663 (etoricoxib), COX-189 (Lumiracocoxib), BMS 347070, RS 57067, NS-398, Bextra (valdecoxib), paracoxib, Vioxx (rofecoxib), SD-8381, 4-Metil-2-(3, 4-dimetilfenil)-1-(4-sulfamoil-fenil)-1H-pirrol, 2-(4-Etoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfamoilfenil)-1H-pirrol, T-614, JTE-522, S-2474, SVT-2016, CT-3, SC-58125 y Arcoxia (etoricoxib). Para inhibidores COX-II adicionales, ver solicitud de Patente U.S. Nos. 10/801.446 y 10/801.429, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad, para todos los propósitos.

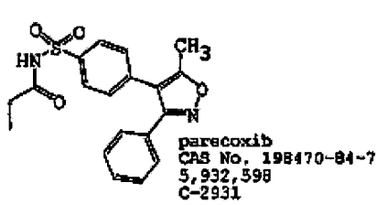
En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es celecoxib, ver la Patente U.S. No. 5.466.823, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad, para todos los propósitos. La estructura para el Celecoxib está mostrada adelante:



En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es valecoxib, ver la Patente U.S. No. 5.633.272, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad, para todos los propósitos. La estructura para el valdecoxib está mostrada adelante:

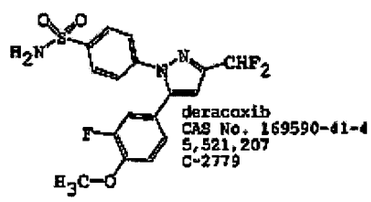


En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es paracoxib, ver la Patente U.S. No. 5.932.598, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad, para todos los propósitos. La estructura para el paracoxib se muestra adelante:

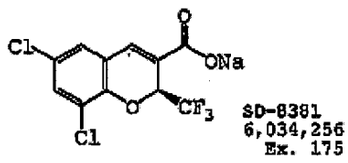


En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es deracoxib, ver la Patente U.S. No. 5.521.207, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia

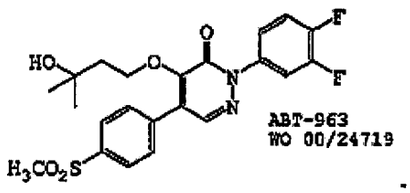
en su totalidad, para todos los propósitos. La estructura para el deracoxib se muestra adelante:



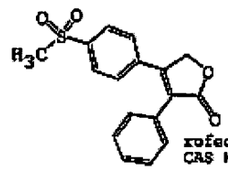
En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es SD-8381, ver la Patente U.S. No. 5.634.256, cuyos contenidos se incorporan como referencia en su totalidad, para todos los propósitos. La estructura para el SD-8381 se muestra adelante:



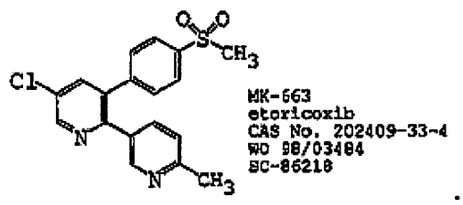
En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es ABT-963, ver la publicación Internacional No. WO 2002/24719, cuyos contenidos se incorporan como referencia en su totalidad, para todos los propósitos. La estructura para el ABT -963 se muestra adelante:



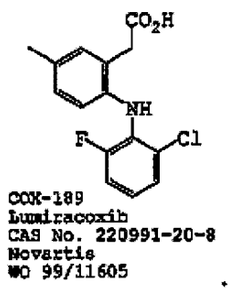
En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es rofecoxib tal como se muestra adelante:



En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es MK-663 (etoricoxib), ver la publicación Internacional Número WO 1998/03484, cuyos contenidos se incorporan como referencia en su totalidad, para todos los propósitos. La estructura para el etoricoxib se muestra adelante:

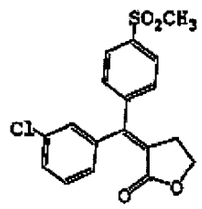


En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es COX-189 (Lumiracoxib), ver la publicación Internacional Número WO 19998/11605, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad, para todos los propósitos. La estructura para el Lumiracoxib se muestra adelante:



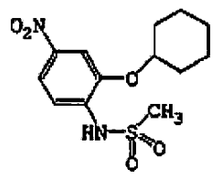
159
143

En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es BMS-347070, ver la Patente U.S. No. 6.180.651, cuyos contenidos se incorporan como referencia en su totalidad, para todos los propósitos. La estructura para el BMS-347070 se muestra adelante:



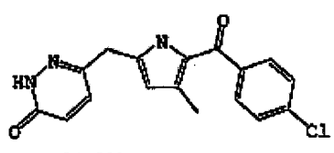
BMS 347070
CAS No. 197438-48-5
6,180,651

En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es NS-398 (CAS 123653-11-2). La estructura para el NS-398 (CAS 123653-11-2) se muestra adelante:



NS-398
CAS No. 123653-11-2

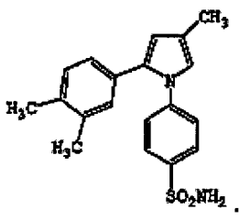
En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es RS-57067 (CAS 17932-91-3). La estructura para el RS-57067 (CAS 17932-91-3) se muestra adelante:



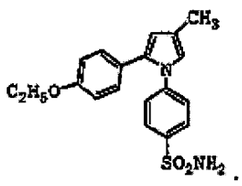
RS 57067
CAS No. 17932-91-3

160
144

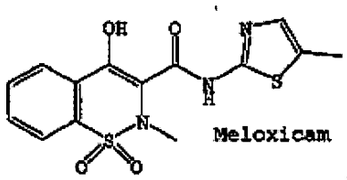
En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es 4-Metil-2-(3, 4-dimetilfenil)-1-(4-sulfamoil-fenil)-1H-pirrol. La estructura para el 4-Metil-2-(3, 4-dimetilfenil)-1-(4-sulfamoil-fenil)-1H-pirrol) se muestra adelante:



En una modalidad preferida, el agente anti-tumor es 2-(4-Etoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfamoilfenil)-1H-pirrol. La estructura para el 2-(4-Etoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfamoilfenil)-1H-pirrol, se muestra adelante:



En una modalidad preferida el agente anti-tumor es meloxican. La estructura para el meloxican se muestra adelante:



Otros inhibidores útiles como agentes anti-tumor usados en conjunto con los anticuerpos de la presente invención y las composiciones farmacéuticas aquí

descritas incluyen la aspirina, y las drogas anti-inflamatorias no esteroides (NSAID), que inhiben la enzima que hace prostaglandinas (ciclooxigenasa I y II) lo que resulta en niveles bajos de prostaglandinas, que incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: Salsalato (Amigesic), Diflunisal (Dolobid), Ibuprofeno (Motrin), Cetoprofen (Orudis), Nabumetona (Relafen), Pirixicam (Feldene), Naproxeno (Aleve, Naprosyn), Diclofenc (Voltaren), Indometacina (Indocin), Sulindac (Clinoril), Tolmetina (Tolectin), Etodolac (Lodine), Ketorolac (Toradol), Oxaprozin (Daypro) y combinaciones de estos. Los inhibidores COX-I preferidos incluyen Ibuprofeno (Motrin), nuprina, naproxen (Aleve), indometacina (Indocin) nabumetona (Relafen) y combinaciones de estos.

Los agentes objetivados usados en conjunto con un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, tal como se describe aquí, y las composiciones farmacéuticas de este tal como aquí descritas, incluyen inhibidores EGFr tales como Iressa (gefitnib, Astra-Zeneca), Tarceva (erlotinilo u OSI-774, OSI Pharmaceuticals Inc.), Erbitux (catuximab, Imclone Pharmaceuticals Inc.), EMD-7200 (Merck AG), ABX-EFG (Amgen Inc. and Abgenix Inc.), HR3 (Gobierno Cubano), anticuerpos IgA (Universidad de Erlangen-Nuremberg), TP-38 (IVAX), proteína de fusión EGFR, vacuna EGF, inmunopolisomas anti-EGFr (Hermes Biosciencies Inc.) y combinaciones de estos.

Los inhibidores EGFr preferidos incluyen Iressa, Erbitux, Tarceva y combinaciones de estos.

La presente invención también se relaciona con los agentes anti-tumor seleccionados de inhibidores de receptor pan erb o inhibidores de receptor ErbB2, tales como CP-724.714 (Pfizer, Inc.), CI-1033 (canernib, Pfizer, Inc.), Herceptina (trastuzumab, Genentech Inc.), Omitarg (2C4, pertuzumab, Genentech Inc). TAK-

762
146

165 (Takeda), GW-572016 (lonafarnib, GlaxoSmithKline), GW-282974 (GlaxoSmithKline), EKB-569 (Wyeth), PKI-166 (Novartis), dHER2 (Vacuna dHER2, Corixa y GlaxoSmithKline), APC8024 (Vacuna HER2, Dendreon), anticuerpo específico dHER2/neu (Decof Cancer Center), B7.her2.lgG3 (Argensys), AS HER2 (Research institute for Rad Bilogy & Medicine), anticuerpos biespecíficos trifuncionales (University of Munich) y mAB AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc.) y mAB 2B-1 (Chiron) y combinaciones de estos. Los inhibidores de receptor pan erbb preferidos incluyen GW572016, CI-1033, EKB-569, y Omitarg y combinaciones de estos.

Los inhibidores adicionales erbB2 incluyen aquéllos en la WO 98/02434 (publicada el 22 Enero de 1998), la WO 99/35146 (publicada el 15 de Julio de 1999), la WO 99/35132 (publicada el 15 de Julio de 1999), la WO 98/02437 (publicada el 22 Enero de 1998), la WO 97/13760 (publicada el 17 de Abril de 1997), la WO 95/19970 (publicada el 27 de Julio de 1995), la Patente E.U.A. No. 5.587.458 (emitida el 24 de Diciembre de 1996), y la Patente U.S. No. 5.877.305 (emitida el 2 de Marzo de 1999), cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Para inhibidores de receptor ErbB2 adicionales se útiles en la presente invención, ver las Patentes E.U.A. Nos. 6.465.449 y 6.284.764, y la Solicitud Internacional No. WO 2001/98277 cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Adicionalmente, se pueden seleccionar otros agentes anti-tumor de los siguientes agentes, Sorafenib (Onyx Pharmaceuticals Inc.; BAY-439006), Genasense, Genta), Panitumunab (Abgenix/Amgen), Zevalin (Schering), Bexxar (Corixaj GlaxoSmithKline), Abarelix, Alimta, EPO 906 (Novartis), discodermolida (XAA-296), ABT-510 (Abbott), Neovastat (Aeterna), enzastaurin (Eli Lilly),

Combrestatina A4P (Oxigene) ZD-6126 (Astra-Zeneca), flavopiridol (Aventis), CYC-202 (Cyclacel), AVE-8062 (Aventis), DMXAA (Roche/Antisoma), Thymitaq (Eximias), Temodar (temozolimida, Schering Plough) y Revilimd (Celegene) y combinaciones de estos.

Otros agentes anti-tumor se pueden seleccionar de los siguientes agentes, CyPat (acetato de ciproterona), Histerelin (acetato de histrelin), Plenaixis (abarelix depot), Atrasentan (ABT-627), Satraplatin (JM-216), talomida (Talidomida), Teratope, Temilifeno (DPPE), ABI-007 (paclitaxel), Evista (raloxifeno), Atamestan (Biomed-777) Xyotax (poliglutamato paclitaxel), Tagetina (bexarotina) y combinaciones de estos.

Adicionalmente, otros agentes anti-tumor se pueden seleccionar de los siguientes agentes, Trizaona (tirapzamina), Aposyn (exisulind), Nevastat (AE-941), Ceplene (diclorhidrato de histamina), Orathecin (BEC2 (mitumoab), Xcytrin (motexafin gadolinio) y combinaciones de estos.

Agentes anti-tumor adicionales se pueden seleccionar de los siguientes agentes, CeaVac (CEA), NeuTrexin (glucuronato de trimetresato) y combinaciones de estos. Agentes anti-tumor adicionales pueden ser seleccionados de los siguientes agentes, OvaRex (oregovomab), Osidem (IDM-1), y combinaciones de estos. Agentes anti-tumor adicionales se pueden seleccionar de los siguientes agentes, Advexin (ING 201), Tirazona (tirapazamina), y combinaciones de estos. Agentes anti-tumor adicionales se pueden seleccionar de los siguientes agentes, RSR13 (efaproxiral), Cotara (131I chTNT 1/b), NBI-3001 (IL-4), y combinaciones de estos. Agentes anti-tumor adicionales se pueden seleccionar de los siguientes agentes, Canvaxina, vacuna GMX, PEG interon A, Taxoprexina (DHA/paciltaxel) y

combinaciones de estos. Otros agentes anti-tumor incluyen MEK1/2 inhibidor PD325901 de Pfizer, inhibidor MEK ARRY-142886 de Array Biopharm, inhibidor CDK2 BMS-387.032, CDK inhibidor PD0332991 de Pfizer y AXD-5438 de AstraZeneca y las combinaciones de. Adicionalmente, los inhibidores mTOR pueden ser utilizados también como CCI-779 (Wyeth) y derivados rapamicina RAD001 (Novartis) y AP-23573 (Ariad), inhibidores HDAC SAHA (Merck Inc./Aton Pharmaceuticals) y combinaciones de estos. Agentes anti-tumor adicionales incluyen inhibidor aurora 2 VX-680 (Vertex) inhibidor Chk1/2 XL844 (ExiliXis).

Los siguientes agentes citotóxicos, por ejemplo, uno o más seleccionados del grupo que consiste de epirubicina (Ellience) docetaxel (Taxitere), paclitaxel, Zinecard (dexrazoxana), rituximab (Rituxan) mesilato imatinib (Gleevec), y combinaciones de estos se pueden utilizar en conjunto con un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, tal como se describe aquí, y las composiciones farmacéuticas de este, tal como descritos aquí.

La invención contempla también el uso de los anticuerpos y las porciones de unión a antígeno de estos de la presente invención junto con terapia hormonal, incluyendo, sin estar limitado a, exesmestano (Aromasina, Pfizer Inc.), leuprorelina (Lupron o Leuplina, TAP/Abbott/Takeda), anastrozol (Arimidex, AstraZeneca), gosrelin (Zoladex, Astra-Zeneca), doxercalciferol, fadrozol, formestano, citrato de tamoxifen, (tamoxifen, Nolvadex, AstraZeneca), Csodex (AstraZeneca), Abarelix (Praecis), Trelstar, y combinaciones de estos.

La invención también se relaciona con agentes de terapia hormonal tales como los anti-estrógenos que incluyen, pero no se limitan a, fulvestrant, toremifeno, raloxifeno, laxofoxifeno, letrozol (Femara, Novartis), anti-andrógenos tales como bicalutamida, flutamida, mifepriston, nilutamida, Casodex® (4'-ciano-3-

(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi- 2-metil-3'-(trifluorometil)propionalida, bicalutamida) y combinaciones de estos.

Adicionalmente, la invención proporciona anticuerpos de la presente invención solos o en combinación con uno o más productos de cuidado de soporte, por ejemplo, un producto seleccionado del grupo que comprende Filgrastim (Neupogen), ondansetron (Zofran), Fragmina, Procrit, Aloxi, Emend, o las combinaciones de estos.

Los agentes citotóxicos particularmente preferidos incluyen Camptosar, Erbitux, Iressa, Gleevec, Taxoter y combinaciones de estos.

Los siguientes inhibidores de topoisomerasa I pueden ser utilizados como agentes anti-tumor, camptotecina, irinotecan, HCl (Campotosar), edotecarina, oratecina (Supergen), exatecan (Daiichi), BN-80915 (Roche) y combinaciones de estos. Los inhibidores de topoisomerasa II preferidos incluyen epirubicin (Ellence).

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar con agentes anti-tumor, agentes de alquilación, anti-metabolitos, antibióticos, agentes anti-tumor derivados de plantas, derivados camptotecina, inhibidores de cinasa tirosina, otros anticuerpos, interferonas, y/o modificadores de respuesta biológica.

Los agentes de alquilación incluyen, pero no se limitan a, N-óxido de mostaza nitrógeno, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan, busulfan, mitobronitot, carboquona, tiotepa, ranimustina, nimustina, temozolamida, AMD-473, altretamina, AP-5280, apaziquona, brostalicina, bendamustina, carmustina, estramustina, fotemustina, glufosfamida, ifosfamida, KW-2170, mafosfamida, y mitolactol; los

compuestos de alquilación coordinados por platino incluyen, pero no se limitan a, cisplatina, Paraplatin (carboplatin), eptaplatina, lobaplatina, nedaplatina, Eloxatin (oxaliplatina, Sanoff) o satrplatin y combinaciones de estos. Agentes de alquilación particularmente preferidos incluyen Eloxatin (oxaliplatin).

Los anti-metabolitos incluyen a, sin estar limitados, metrotrexato, 6-mercaptopurina ribosida, mercaptopurina, 5-fluorouracilo (5-FU) sólo o en combinación con leucovorina, tegafur, UFT, doxifluridina, carmofur, citabarina, cytabarine ocfosfato, enocitabina, S-1, Alimta (premetrexed disodio, LY231514, MTA), Gemzar (gemcitabina, Eli Lilly), fludarabina, 5-azacitidina, capecitabina, cladribina, clofarabina, decitabina, eflormitina, etinilcitinina, citosina arabinosida, hidroxiurea, TS-1, melfalan, nelarabina, nolatrexed ocfosfato, disodio premetrexed, pentostatina, pelitrexol, raltitrexed, triapina, trimetrexato, vidabarina, vincristina, vinorelbina; o por ejemplo, uno de los anti- metabolitos preferidos descrito en la Solicitud de Patente Europea No. 239362 tal como ácido N-(5-[N -(3, 4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin -6-ilmetil)-N-metilamino]-2-teonil)-L- glutámico, y combinaciones de estos.

Los antibióticos incluyen, pero no se limitan a: aciarubicina, actinomicina D, amrubicina, annamicina, adriamicina, bleomicina, daunorubicina, doxorubicina, elsamitrucina, epirubicina, galarubicina, idarubicina, mitomicina C, nemorubicina, neocarzinostatina, peplomicina, pirarubicina, rebeccamicina, estimalamer, estreptozocina, valrubicina, zinostatin y combinaciones de estos.

Las sustancias anti-tumor derivadas de plantas incluyen, por ejemplo, aquellas seleccionadas, por ejemplo, de vinblastina, docetaxel (Taxotere), paclitaxel y combinaciones de estos.

Los agentes de inhibición de topoisomerasa citotóxica incluyen uno o más aclarubicn, amonafida, belotecán, camptotecina, 10-hidroxicamptotecina, 9-aminocamptotecina, diflomotecán, irinotecan HCl (Camptosar), edotecarina, epirubicina (Ellence), etoposida, exatecán, gimatecán, lurtotecán, mitoxantrona, pirarubicina, pixantrona, rubitecán, esobuzoxano, sN-38, tafluposida, topotecán, y combinaciones de estos.

Los agentes inhibidores de la topoisomerasa citotóxica incluyen uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste de camptotecina, 10-hidroxicamptotecina, 9-aminocamptotecina, irinotecan HCl (Camptosar), edotecarina, epirubicin (Ellence), etoposida, SN-38, topotecan, y combinaciones de estos.

Los inmunológicos incluyen a las interferones y otros numerosos agentes de mejora inmune. Los interferones incluyen interferón alfa, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta, interferón gamma-1a, interferón gamma-1b (Actinmune), o interferón gamma-n1 y combinaciones de estos. Otros agentes incluyen filgrastim, lentinan, sizofilan, TheraCys, ubenimex, WF-10, aldesleucina, alemtuzumab, BAM-002, dacarbazina, daclizumab, denileucina, gemtuzumab ozogamicina, ibritumomab, imiquimod, lenograstim, lentinan, vacuna melanoma (Corixa), molgarmostim, OncoVAX-CL, sargramostim, tasonermina, tecleucina, timalasina, tositumomab, Virulizina, 2-100, epratuzumab, mitumomab, oregovomab, pemtumomab (Y-muHMFG1), Provenge (Dendreon), y combinaciones de estos.

Los modificadores de respuesta biológica son agentes que modifican los mecanismos de defensa de los organismos vivientes o respuestas biológicas, tales como sobre vivencia, crecimiento, o diferenciación de células de tejido para dirigirlas a tener actividad anti-tumor. Tales agentes incluyen krestina, lentinan, sizofran, picibanil, ubenimex o las combinaciones de estos.

Otros agentes anti-cáncer incluyen alitretinoina, ampligen, atrasenta bexatoten, bortezomib, Bosentan, calcitrol, exisulind, finasterida, fotemustina, ácido ibandrónico, mitefosina, mitoxantrona, l-asparginasa, procarbazina, dacarbazina, hidrocarbamida, pegaspargasa, pentostatina, tazarotne, Telcyta (TLK-286, Telik Inc.), Velcade (bortemazib, Millenium), tetrinoina, y combinaciones de estos.

Otros compuestos angiogénicos incluyen acitretina, fenretinida, talidomida, ácido zoledrónico, angiostatina, aplidina, cilengtida, combretastatin A-4, endostatina, halofuginona, rebimastat, removab, Revlimid, esqualamina, ucraina, Vitaxin y combinaciones de estos.

Los compuestos coordinados por platino incluyen, pero no se limitan a, cisplatina, carboplatina, nedplatina, oxaliplatina, y las combinaciones de estos.

Otros derivados de camptotecina incluyen, pero no se limitan a, 10-hidroxicamptotecina, 9-aminocamptotecina, irinotecan HCl (Camptosar), edotecarina, epirubicin (Ellence), etoposide, SN-38, topotecan, y combinaciones de estos.

Otros agentes anti-tumor incluyen mitoxantrona, l-asparginasa, procarbazina, dacarbazina, hidrocarbamida, pentostatina, tetrinoina, y combinaciones de estos.

También se pueden utilizar agentes anti-tumor capaces de mejorar las respuestas inmunes antitumor, tales como los anticuerpos CTLA-4 (antígeno 4 linfocito citotóxico), y otros agentes capaces de bloquear a CTLA-4, tales como los compuestos MDX-010 (Medarex) y CTLA-4 descritos en la PAtente U.S. No. 6.682.736, y agentes antiproliferativos tales como otros inhibidores de la transferasa de proteína farnesilo, por ejemplo los inhibidores de la transferasa de proteína farnesilo. Para anticuerpos específicos CTLA-4 que se pueden utilizar en la presente invención ver la Solicitud de Patente Provisional de los E.U.A. 60/113.647 (presentada el 23 de Diciembre de 1998), la Patente U.S. No. 6.682.736 ambas incorporadas aquí como referencia en su totalidad. Por ejemplo, otro anticuerpo anti-CTLA-4 que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención es ticilimumab, que tiene la secuencia del anticuerpo Monoclonal 11.2.1 en la Patente U.S. No. 6.682.736.

Para los anticuerpos IGF1R específicos que se pueden utilizar en la presente invención, ver la Solicitud de Patente Internacional No. WO 2002/053596, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Para anticuerpos CVD40 específicos que se pueden utilizar en la presente invención, ver la Solicitud de Patente Internacional No. WO 2003/040170, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Agentes de terapia de gen pueden ser empleados como agentes anti-tumor tales como TNFerade (GeneVec), que expresa el TNFalfa en respuesta a la radioterapia.

En una modalidad de la presente invención, se pueden utilizar las estatinas en conjunto con un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este, como se describe aquí, y las composiciones farmacéuticas de estos. Las estatinas (inhibidores de la reducatasa HMG-CoA) pueden ser seleccionadas del grupo que consiste Atorvastatina (Lipitor, Pfizer Inc.), Pravachol, Bristol-Myers Squibb), Lovastatina (Mevacor, Merck Inc.), Simvastatina (Zocor, Merck Inc.), Fluvastaina (Lescol, Novartis), Cerivastatina (Baycol, Bayer), Rosuvastatina (Crestor, AstraZeneca), Lovostatina y Niacin (Advicor, Kos Pharmaceuticals), derivados y combinaciones de estos.

En una modalidad preferida, la estatina se selecciona del grupo que comprende Atorvastatina y Lovastatina, derivados y combinaciones de estos.

Otros agentes útiles como agentes anti-tumor incluyen Caduet.

Para cualquiera de los métodos de tratamiento de un trastorno hiperproliferativo o crecimiento anormal de una célula, tal como se describe aquí, utilizar una combinación de un anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este con por lo menos un agente terapéutico adicional, el anticuerpo anti-ALK-1 puede ser conjugado, o derivado, con el agente terapéutico adicional. En por lo menos un agente terapéutico adicional también puede ser administrado separadamente, o en una manera no derivada o no conjugada. Cuando el por lo menos una agente terapéutico adicional no es derivado o conjugado al anticuerpo,

el mismo se puede administrar dentro de la misma formulación farmacéutica como el anticuerpo, o puede ser administrado en una formulación separada.

Tratamiento de la Pérdida de la Visión

Los compuestos de la invención y las composiciones farmacéuticas que los contienen, son útiles para el tratamiento de pérdidas de visión graves por la degeneración macular relacionada con la edad y otras enfermedades que afectan el segmento posterior del ojo, tales como neovascularización coroidal, retinopatía diabética, glaucoma, retinitis pigmentosa, y las similares.

Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden utilizar para formar un depósito de drogas detrás del ojo y pueden incluir uno o más agentes farmacéuticamente activos, adicionalmente de uno o más excipientes no activos como se describe aquí. Ejemplos de agentes farmacéuticamente activos, útiles en las composiciones de la invención incluyen los anti-infecciosos, incluyendo, sin limitación, los antibióticos, antivíricos, y anti-hongos; los agentes antialergénicos y estabilizadores de mastocitos; agentes anti-inflamatorios esteroides y no esteroides (tales como nepafenac); inhibidores de ciclooxigenasa, incluyendo, sin limitación, inhibidores CoxI y Cox II; combinaciones de agentes anti-infecciosos y anti-inflamatorios; descongestionantes; agentes anti-glaucoma, incluyendo, sin limitación, agentes adregérnicos, agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, agonistas alfa-adrenérgicos, agentes parasipatomiméticos, inhibidores de colinestearasa, inhibidores de anhidrasa carbónica, y prostaglandinas; combinaciones de agentes antiglaucoma; antioxidantes; complementos nutricionales; drogas para el tratamiento de edema macular cistoide que incluye, sin limitación, agentes antiinflamatorios no esteroides, drogas para el tratamiento

de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) incluyendo la AMD no exudativa (seca) y la exudativa (húmeda), incluyendo, sin limitación, inhibidores de angiogénesis, incluyendo los inhibidores de angiogénesis que inhiben los receptores de cinasa proteína, incluyendo los receptores de cinasa proteína que son receptores VEGF; y complementos nutricionales; drogas para el tratamiento de las infecciones herpéticas y las infecciones oculares CMV; drogas para el tratamiento de la vitreoretinopatía proliferativa incluyendo, sin limitación, anti-metabolitos y fibrinolíticos; agentes de modulación de heridas, incluyendo, sin limitación, factores de crecimiento; anti-metabolitos; drogas neuroprotectoras, incluyendo, sin limitación, eliprodilo; y los esteroides angiostáticos para el tratamiento de enfermedades o condiciones de segmento posterior 26, incluyendo, sin limitación, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) incluyendo la AMD de neovascularización no exudativa (seca) y exudativa (húmeda), neovascularización coroidal, retinopatías, retinitis, uveitis, edema macular, y glaucoma. Para información adicional acerca de tales esteroides angiostáticos ver las Patentes U.S. Nos. 5.679.666 y 5.770.592. Un anti-inflamatorio no esteroide para el tratamiento de la edema macular cistoide es nepafenac.

Para la administración en el ojo, un compuesto de la presente invención un compuesto de la presente invención se suministra en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable de manera tal que el compuesto se mantiene en contacto con la superficie ocular por un período de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre la córnea y/la esclerótica y las regiones internas del ojo, incluyendo, por ejemplo, la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/ciliar, lentes, coroide/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser un ungüento, un

aceite vegetal, o un material de encapsulación. Un compuesto de la invención puede ser inyectado también dentro del humor vítreo o humor acuoso.

Adicionalmente, un compuesto puede ser administrado también mediante métodos bien conocidos y aceptables tales como las inyecciones sub- Tenon y/o sub-conjuntivales. Como se conoce bien en la técnica oftálmica, la mácula está compuesta principalmente de conos de retina y es la región de máxima agudeza visual en la retina. Una cápsula de Tenon o membrana de Tenon está dispuesta sobre la esclerótica. Una conjuntiva cubre un área corta del globo del ojo posterior hacia el limbo (la conjuntiva bulbar) y se pliega hacia arriba (fondo de saco superior) o hacia abajo (fondo de saco inferior) para cubrir las áreas internas del párpado superior y el párpado inferior, respectivamente. La conjuntiva está dispuesta sobre la parte superior de la cápsula de Tenon. La esclerótica y la cápsula de Tenon definen la superficie exterior del globo del ojo. Para el tratamiento de las enfermedades oculares tales como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) incluyendo la AMD no exudativa (seca) y exudativa (húmeda), neovascularización coroidal, retinopatías (tales como retinopatía diabética o retinopatía de prematuro), edema macular diabético, retinitis, uveitis, edema macular cistoide (CME), glaucoma, y otras enfermedades o condiciones del segmento posterior del ojo, es preferible disponer de un depósito de una cantidad específica de un agente farmacéuticamente activo oftálmicamente aceptable directamente sobre la superficie externa de la esclerótica y por debajo de la cápsula de Tenon. En adición, en los casos de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) incluyendo l no exudativa (seca) y exudativa (húmeda) y CME es más preferible para disponer el depósito directamente sobre la superficie externa de la esclerótica, por debajo de la cápsula de Tenon y, generalmente, sobre la mácula.

Los compuestos pueden ser formulados como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción duradera se pueden administrar mediante la implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente) de una inyección intramuscular o la inyección sub-Tenon arriba mencionada o intravitreal. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógeno, antes del uso.

Dentro de las modalidades particularmente preferidas de la invención, los compuestos se pueden preparar para la administración tópica en solución salina (combinada con cualquiera de los agentes conservantes y antimicrobianos utilizados comúnmente en las preparaciones oculares) y administrados en forma de gotas ópticas y administrados directamente a la córnea.

Dentro de las modalidades preferidas, la composición se prepara con un polímero muco-adhesivo que se une a la córnea. Así, por ejemplo, los compuestos pueden estar formulados con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o como derivados solubles ligeramente, por ejemplo, como una sal ligeramente soluble.

Un portador farmacéutico para compuestos hidrófobos es un sistema codisolvente que comprende alcohol bencílico, un tensoactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua, y una fase acuosa. El sistema codisolvente puede ser un sistema co-disolvente VPD. El VPD es una solución de 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del tensoactivo no polar polisorbato 80, y 65% p/v de

polietilenglicol 300, hecho a volumen en etanol absoluto. El sistema codisolvente VPD (VPD-5W) contiene VPD diluido 1: 1 con una solución de 5% de dextrosa en agua. Este sistema codisolvente disuelve bien los compuestos hidrófobos, y produce por sí mismo baja toxicidad luego de administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de un sistema codisolvente pueden ser variadas considerablemente sin destruir las características de solubilidad y toxicidad. Adicionalmente, la identidad de los componentes del codisolvente pude ser variada: por ejemplo, se pueden utilizar otros tensoactivos no polares de baja toxicidad en lugar del polisorbato 80; el tamaño de fracción del polietilenglicol puede ser variado; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol; por ejemplo, polivinil pirrolidona y otros azúcares o polisacáridos pueden ser substituidos por dextrosa.

Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de suministro para los compuestos farmacéuticos hidrófobos. Las liposomas y las emulsiones son ejemplos conocidos de vehículos de suministro o portadores para las drogas hidrófobas. Ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido también se pueden emplear, aunque usualmente al costo de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos se pueden suministrar utilizando un sistema de liberación sostenida, tal como las matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido varios materiales de liberación sostenida y son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos por unas pocas semanas hasta 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de la proteína.

776
160

Las composiciones farmacéuticas pueden también consistir de portadores o excipientes adecuados en fase sólida o gel. Ejemplos de tales portadores o excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como los polietilenglicoles.

Cualquiera de las composiciones puede ser formulada para la administración a un individuo. Un individuo en la presente invención es preferiblemente un mamífero, o preferiblemente un humano.

Las formulaciones farmacéuticas aquí pueden incluir un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste de Clorhidrato de Acodazol; Acronina; Adozelesina; Aldesleukin; Altetramina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminogluteimida; Amsacrina; Anastrozola; Antramicina; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batismastat; Benzodepa; Bicalutamida; Clorhidrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesin; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sódico; Bropirimina; Busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatin; Carmustina; Clorhidrato de Carubicin; Carzelesin; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatin; Cladribrina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Clorhidrato de Daunorubicina; Decitabina; Dexormaplatin; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Clorhidrato de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Clorhidrato de Eflornitina; Elsamitucina; Enloplatina; Enpromato; Epipropidina; Clorhidrato de Epirubicina, Erbulozola; Clorhidrato de Esorubina; Estramustina; Fosfato de Sodio Estramustina; Etanidazol; Aceite Etiodizado I 131; Etoposido; Fosfato Etoposido; Etoprina; Clorhidrato de Fadrozola; Fazarabina;

Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludaramina; Fluorouracil; Fluorocitabina; Fosquidona; Fostriecin Sódico; Gemcitabina; Clorhidrato de Gemcitabina; Gold Au I98; Hidroxiurea; Clorhidrato de Idarubicina; Ifosmamida; Imofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-Ia; Interferón Gamma-Ib; Iproplatin; Clorhidrato de Irinotecan; Acetato de Lanretido; Letrozola; Acetato de Leuprolida; Clorhidrato de Liarozola; Lometrexol Sódico; Lomustina; Clorhidrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maitansina; Clorhidrato de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Mefalan; Menogarilo; Mercatopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedepa; Mitindomida; Mitocarcin; Mitocromin; Mitogillin; Mitomalcin; Mitomicina; Mitosper; Mitotana; Clorhidrato de Mitoxantrona; Acido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatin; Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobroman; Piposulfan; Clorhidrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sódico; Porfiromicina; Prednimustina; Clorhidrato de Procarbazina; Puromicina; Clorhidrato de Puromicina; Pirazofurin; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Clorhidrato de Safingol; Semustina; Simtrazena; Sparfostato Sódico; Sparsomicina; Clorhidrato de Spirogermanium; Spiromustina; Spiroplatin; Streptonigrin; Stretozocin; Cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenor; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalan Sódico; Tegafur; Clorhidrato de Teloxantrona; Temoporfin; Teniposida; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurin; Tirapazamina; Clorhidrato de Topotecan; Citrato de Toremifeno; Acetatode Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucoronato de Trimetrexato; Triptorelin; Clorhidrato de Tubulozola; Mostaza Uracilo; Uredepa; Vapreotida; Verteporfin; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sukfato de Vinepidina; Sukfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de

Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozola; Zeniplatin; Zinostatina; Clorhidrato de Zorubicina.

Un agente anti-angiogénico es cualquier agente que inhibe la angiogénesis, sea que se describe aquí o que se conoce en la técnica. En modalidades preferidas, un agente angiogénico es un agente anti-VEGF, tal como Macugen™ (Eyetech, Nueva York, NY); o anticuerpo anti-VEGF.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas mediante técnicas estándar utilizando uno o más portadores, excipientes, y diluentes adecuados. *Ver, por ejemplo*, Remington's Pharmaceutical Sciences, (19th Ed. Williams & Wilkins, 1995) (incorporadas aquí como referencia para todos los propósitos).

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral adecuada incluyen formulaciones acuosas y no acuosas isotónicas con la sangre del recipiente esperado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir sistemas suspendidos diseñados para objetivar el compuesto hacia los componentes de la sangre de uno o más órganos. Las formulaciones se pueden presentar en contenedores sellados de dosis unitaria o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas o frascos. Para las formulaciones intraoculares, se prefieren las dosificaciones unitarias porque no hay conservantes en la formulación. Para otras formulaciones parenterales, se pueden utilizar los conservantes, lo que pudiera permitir contenedores multi-dosis.

Las soluciones de inyecciones extemporáneas y suspensiones se pueden preparar, por ejemplo, a partir de polvos estériles. Las formas parenteral e

intravenosa pueden incluir también minerales y otros materiales para hacerlas compatibles con el tipo de inyección o sistema de suministro escogido.

Las administraciones parenterales particulares contempladas por la presente invención incluyen las administraciones intraocular y e intravenosa al ojo. Las formulaciones farmacéuticas para las administraciones intraocular e intravenosa ocluyen solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y solución de sal isotónica balanceada (BSS), con o sin excipientes tales como mannitol o sorbitol como estabilizadores de proteína.

En general, las soluciones de agua, aceite adecuado, solución salina, dextrosa acuosa (glucosa), o soluciones de azúcar relacionada y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles son portadores adecuados para las soluciones parenterales. Las soluciones para la administración parenteral contienen preferiblemente una sal soluble en agua del ingrediente activo, agentes estabilizadores adecuados y, sí es necesario, sustancias amortiguadoras. Agentes antioxidantes, tales como bisulfito de sodio, sulfito de sodio, o ácido ascórbico, sean solos o combinados, son agentes de estabilización adecuados. También son utilizadas las sales de ácido cítrico de estos, o EDTA de sodio. En adición, las soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil- o propil parabeno, o clorobutanol. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington, citado supra.

En cualquiera de las modalidades aquí, una composición o formulación farmacéutica aquí se puede liofilizar.

En cualquiera de las modalidades aquí, las formulaciones farmacéuticas tienen preferiblemente menos de aproximadamente 10, más preferiblemente menos de aproximadamente 5, más preferiblemente menos de aproximadamente 3, o más preferiblemente menos de aproximadamente 1 unidad(es) de endotoxínas por mili gramo de agentes terapéuticos.

En algunas modalidades, los métodos de tratamiento aquí descritos incluyen adicionalmente administrar a un individuo que sufre de una condición angiogénica, uno o más agentes terapéuticos seleccionado del grupo que consiste de agentes antineoplásicos, agentes antivíricos, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-bacterianos, agentes anti-angiogénicos, o agentes anti-angiogénicos.

Tales tratamientos de combinación pueden ser logrados ya sea mediante la administración a un individuo de la co-formulación de las composiciones aquí con los agentes terapéuticos o al administrar las composiciones aquí y los agentes terapéuticos como dos formulaciones farmacéuticas separadas. En las modalidades en donde es administrada más de una composición/agente terapéutico a un individuo, se pueden utilizar dosificaciones más bajas de las composición(es) y/o agente(s) terapéutico(s) como un resultado del efecto sinérgico de ambos ingredientes activos.

Los agentes antineoplásicos que se pueden administrar a un individuo incluyen, pero no se limitan a, Aclarubicina; Clorhidrato de Acodazol; Acronina; Adozelesin; Aldesleukin; Altetramina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutehimida; Amsacrina; Anastrozola; Antramicina; Asparaginasa; Asperlin; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batismastat; Benzodepa; Bicalutamida; Clorhidrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesin; Sulfato de

Bleomicina; Brequinar Sódico; Bropirimina; Busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatin; Carmustina; Clorhidrato de Carubicin; Carzelesin; Cedefingol; Clorambucil; Cirolemicina; Cisplatin; Cladribrine; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Clorhidrato de Daunorubicina; Decitabina; Dexormaplatin; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; 119 Doxorubicina; Clorhidrato de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Clorhidrato de Eflornitina; Elsamitucin; Enloplatin; Enpromato; Epipropidina; Clorhidrato de Epirubicina, Erbulozola; Clorhidrato de Esorubina; Estramustina; Fosfato de Sodio Estramustina; Etanidazol; Aceite Etionizado 1 131; Etoposido; Fosfato Etoposido; Etoprina; Clorhidrato de Fadrozola; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludaramina; Fluorouracil; Fluorocitabina; Fosquidona; Fostriecin Sódico; Gemcitabina; Clorhidrato de Gemcitabina; Gold Au 198; Hidroxiurea; Clorhidrato de Idarubicina; Ifosmamida; Imofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-Ia; Interferón Gamma-Ib; Iproplatin; Clorhidrato de Irinotecan; Acetato de Lanretido; Letrozola; Acetato de Leuprolida; Clorhidrato de Liarozola; Lometrexol Sódico; Lomustina; Clorhidrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maytansina; Clorhidrato de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Mefalan; Menogaril; Mercatopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedepa; Mitindomida; Mitocarcin; Mitocromin; Mitogillin; Mitomalcin; Mitomicina; Mitosper; Mitotana; Clorhidrato de Mitoxantrona; Acido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatin; Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobroman; Piposulfan; Clorhidrato de Piroxan trona; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sódico; Porfiromicina; Prednimustina; Clorhidrato de Procarbazina; Puromicina; Clorhidrato de Puromicina; Pirazofurin; Riboprina; Rogletimida;

166
X32
166

Safingol; Clorhidrato de Safingol; Semustina; Simtrazena; Sparfostato Sódico; Sparsomicina; Clorhidrato de Spirogermanium; Spiromustina; Spiroplatin; Streptonigrin; Stretozocin; Cloruro de Estrocio Sr 89; Sulofenor; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalan Sódico; Tegafur; Clorhidrato de Teloxantrona; Temoporfin; Teniposida; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurin; Tirapazamina; .Clorhidrato de Topotecan; Citrato de Toremifeno; Acetatode Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucoronato de Trimetrexato; Triptorelin; Clorhidrato de Tubulozola; Mostaza Uracilo; Uredepa; Vapreotida; Verteporfin; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; 120 Sukfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozola; Zeniplatin; Zinostatina; Clorhidrato de Zorubicina.

Los agentes antibacterianos que se pueden administrar a un individuo incluyen, pero no se limitan a, penicilinas, aminoglicósidos, macrólidos, monobactams, rifamicinas, tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, imipenem, ácido fusídico, novobiocina, fosfomicina, fusidato sódico, neomicina, polimixina, capreomicina, colistimetato, colistina, gramicidina, minociclina, doxiciclina, vanomicina, bacitracina, canamicina, gentamicina, eritromicina y cefalosporinas.

Los agentes anti-inflamatorios que se pueden administrar a un individuo incluyen, pero no se limitan a, NSAIDS (por ejemplo, aspirina (salicilamida), salicilamida sódica, indoprofen, indometacina, trihidrato de indometacina sódica, Bayer™, Bufferin™, Celebrex™, diclofenac, Ecotrin™, diflunisal, fenoprofen,

182
183
167

naproxen, sulindac, Vioxx™), corticosteroides o corticotropina (ACTH), colchicina, y acetado de anecortavo.

Los agentes antivíricos que se pueden administrar a un individuo incluyen, pero no se limitan a, a-metil-P-adamanteno metilamina, 1, -D- ribofuranosil-1, 2, 4-triazolo-3, carboxamida, 9-[2-hidroxi-etoxi]metilguanina, adamantanaminaa, 5-yodo-2'-desoxiuiridina, trifluorotimidina, interferón, adenina arabinosida, CD4, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 9-(2- hidroxietoximetil)guanina (aciclovir), ácido fosfonofórmico, 1-adamantanamina, péptido T, y 2', 3'didesoxiciclidina.

La administración de una composición de la presente invención a una célula objetivo *in vivo* se puede lograr utilizando cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica.

Por ejemplo, las composiciones de la presente invención se pueden administrar sistémica o localmente por cualesquiera medios conocidos en la técnica (por ejemplo, oralmente, intraocularmente, intravascularmente (i.v.), intradérmicamente, intramuscularmente, transdérmicamente, transmucosamente, entéricamente, parenteralmente, por inhalación de pulverizado, rectalmente, o tópicamente) en unidades de dosificación de formulaciones y que contienen portadores convencionales farmacéuticamente aceptables, coadyuvante y vehículos.

Como se utiliza aquí, el término intra-ocularmente incluye intravitreal, sub-retinal, y similares.

Como se utiliza aquí, el término parenteral incluye, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intrasternal, técnicas de infusión o intra- peritonealmente. Los supositorios para la administración rectal de la droga se pueden preparar mediante la mezcla de la droga con un excipiente adecuado no irritante tal como mantequilla de cacao y poietilenglicoles que son sólidos a temperatura ordinaria pero líquidos a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirán en el recto y se libera la droga.

El régimen de dosificación para el tratamiento de un trastorno o enfermedad con las composiciones de esta invención está basado en una variedad de factores, incluyendo el tipo de enfermedad, la edad, peso, sexo, condición médica del paciente, la gravedad de la condición, la ruta de administración, y el compuesto particular empleado. Así, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero puede ser determinado rutinariamente utilizando métodos estándares.

Para la administración sistémica, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este de la presente invención y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran preferiblemente en una dosis de por lo menos 0, 05, 0, 1, 0, 2, 0, 3, 0, 4, 0, 5, 0, 6, 0, 7, 0, 8, 0, 9, 0, 9, 1, 0, 2, 0, 3, 0, 4, 0, 5, 0, 6, 0, 7, 0, 8, 0, 9, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, o 150 mg/kg de peso corporal. En otras modalidades, los polipéptidos (preferiblemente dímeros u homodímeros) y/o moléculas pequeñas aquí se administran en una dosis de 0, 1-100 mg/kg, más preferiblemente 0, 5-50 mg/kg, más preferiblemente 1-30 mg/kg de peso corporal, o más preferiblemente 5-20 mg/kg.

Para la administración localizada, el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este de la presente invención y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran preferiblemente en una dosis de por lo

menos 50 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg, 450 µg, 500 µg, 550 µg, 600 µg, 650 µg, o 700 µg. En otras modalidades, los polipéptidos (preferiblemente dímeros u homodímeros) y/o moléculas pequeñas aquí se administran localmente en una dosis de 50-1000 µg, más preferiblemente 100-800 µg, más preferiblemente 200-500 µg, o más preferiblemente 300-400 µg.

Por ejemplo, para la administración dérmica el anticuerpo anti-ALK-1 o porción de unión a antígeno de este de la presente invención y/o los peptidomiméticos y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran en una dosis de 50-1000 µg/cm^2, más preferiblemente 100-800 µg/cm^2, más preferiblemente 200-500 µg/cm^2. En otro ejemplo, para la administración ocular, se administran los polipéptidos y/o peptidomiméticos y/o moléculas pequeñas en la presente en una dosis de 50-1000 µg/ojo, más preferiblemente 100-800 µg/ojo, o más preferiblemente 200-500 µg/ojo.

Las composiciones farmacéuticas incluyen preferiblemente el ingrediente activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-ALK-1) en una cantidad efectiva, es decir, en una cantidad efectiva para lograr el beneficio terapéutico o profiláctico. La cantidad efectiva real para una aplicación particular dependerá de la condición que está siendo tratada y de la ruta de administración. La determinación de una cantidad efectiva está bien dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción de la presente.

Preferiblemente, la cantidad efectiva del 'ingrediente activo, por ejemplo, un anticuerpo anti-ALK-1, es desde aproximadamente 0, 0001 mg a aproximadamente 500 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal de un paciente, más preferiblemente desde aproximadamente 0, 001 mg hasta

aproximadamente 250 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal de un paciente, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0, 01 mg hasta aproximadamente 100 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal del paciente, y aún más preferiblemente desde aproximadamente 0, 5 mg hasta aproximadamente 50 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal de un paciente, y más preferiblemente desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 15 mg de agente activo por kilogramo de peso corporal del paciente.

En términos de porcentaje por peso, las formulaciones de la presente invención comprenderán preferiblemente del agente activo, por ejemplo, un anticuerpo anti-ALK-1, en una cantidad de desde aproximadamente 0, 0001 hasta aproximadamente 10% por peso, más preferiblemente desde aproximadamente 0, 001 hasta aproximadamente 1% por peso, más preferiblemente desde aproximadamente 0, 05 hasta aproximadamente 1% por peso, o más preferiblemente desde aproximadamente 0, 1 hasta aproximadamente 0, 5% por peso.

Terapia de Gen

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos y las porciones del anticuerpo de la presente invención se pueden administrar a un paciente en necesidad de las mismas vía terapia de gen. La terapia puede ser ya sea *in vivo* o *ex vivo*. En una modalidad preferida, las moléculas de ácido nucleico que codifican tanto a una cadena pesada como a una cadena liviana se administran a un paciente. En una modalidad más preferida, las moléculas de ácido nucleico se administran de manera tal que son integradas establemente

dentro de los cromosornas de las células B debido a que estas células están especializadas en la producción de anticuerpos. En una modalidad preferida, las células B precursoras son transfectadas o infectadas ex vivo y re-transplantadas en un paciente en necesidad de este. En otra modalidad, las células B precursoras u otras células son infectadas *in vivo* utilizando un virus conocido para infectar el tipo de célula de interés. Los vectores típicos usados para la terapia de gen incluyen vectores liposomas, plásmidos, y víricos. Vectores víricos de ejemplo son los retrovirus, adenovirus y virus asociados con adeno. Después de la infección, ya sea *in vivo* o ex vivo, los niveles de expresión del anticuerpo pueden ser monitoreados mediante la toma de una muestra del paciente tratado y utilizando cualquier inmunoensayo conocido en la técnica o discutido aquí.

En una modalidad preferida, el método de terapia de gen comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada o la porción de unión a antígeno de este y expresar la molécula de ácido nucleico. En otra modalidad, el método de terapia de gen comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena liviana o la porción de unión a antígeno de este de un anticuerpo anti-ALK-1 y expresar la molécula de ácido nucleico. En un método más preferido, el método de terapia de gen comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de este y una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la cadena liviana o la porción de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-ALK-1 de la invención y expresar las moléculas de ácido nucleico. El método de terapia de gen puede comprender también la etapa de administrar otro agente terapéutico, tal como cualquiera de los agentes discutidos aquí previamente en conexión con la terapia de combinación.

172

Método para Tamizar Antagonistas o Agonista ALK-1

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para determinar sí una sustancia inhibe la sobre-regulación de un gen objetivo con dirección 3' específico de ALK-1, Id1, tal como, por ejemplo, el Ensayo Taqman para Id1 descrito en el Ejemplo 12. El método comprende poner en contacto una muestra de células que expresa Id1 con la sustancia y determinar sí la expresión Id1 se inhibe, en donde un nivel reducido de expresión Id1 es indicativo de que dicha sustancia inhibe la expresión Id1. En una modalidad específica, la sustancia es un anticuerpo que une al dominio extracelular de ALK-1. En otra modalidad, la sustancia es una molécula pequeña. De acuerdo con la invención, las células pueden expresar inherentemente tanto el ALK-1 como el Id1, tal como los HUVEC descritos en el Ejemplo 12, o que hayan sido transformados o transfectados con ADN que codifica uno o más de estos. Uno puede determinar la expresión Id1 vía, por ejemplo, el uso del Ensayo Tagman para Id1 descrito en el Ejemplo 12.

Por el contrario, los activadores o agonistas pueden también ser probados, o utilizados, siguiendo el mismo tipo de procedimientos.

A fin que esta invención pueda ser mejor comprendida se establecen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solo para propósitos ilustrativos y no se construyen como limitantes del alcance de la invención en ninguna forma.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos y preparaciones, "MW" significa peso molecular; "His- Tag" significa una marca de polihistidina de terminal C (6xHis) para la purificación rápida con resina quelante de níquel y detección con un anticuerpo anti-His (C-term); "BSA" significa albúmina de suero bovino; "EDTA" significa ácido etilenodiaminotetraacético; "DMSO" significa dimetil sulfóxido; "MOPS" significa ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico; "MES" significa ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico; "PBS" significa solución salina amortiguada con fosfato; "dPBS" significa solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco; "FBS" significa suero fetal de bovino; "NEAA" significa aminoácidos no esenciales; "HEPES" significa ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2- etanosulfónico; y "DMF" significa dimetil formamida.

Ejemplo 1. Preparación Inmunógena de ALK-1

El ECD de ALK-1 se clona a partir de un clon de longitud completa ALK-1 ORF humano (Invitrogen, Clon ID IOH21048) mediante PCR utilizando cebadores 5'-ACGGCCCAGCCGGCCGACCCTGTGAAGCCGTCT (SEQ ID NO: 96) delantero y 5'-ACTAAGCTTTTAATGATGATGATGATGCTGGCATCCTGTTCCCG (SEQ ID NO: 97) inversos. El producto PCR se purifica, se trata con enzimas de restricción SfiI y HindIII, y se clona dentro del lugar SfiI/HindIII de un vector de expresión mamífero pSecTag2/Hygro (Invitrogen Inc., No. de Catálogo V910-20). El clon fue usado para transfectar transientemente las células 293T con reactivo de transfección Fugene 6 (Roche Applied Science, No. de Catálogo 1814443) siguiendo las instrucciones de fabricación. El sobrenadante del cultivo de células

que contiene la proteína objetivo secretada fue cosechado por 72 horas post-transfección y se le permite a la resina Ni- NTA (QIAGEN, No. Catálogo 30430) a 4° C durante toda la noche. La resina fue lavada entonces con amortiguador conteniendo 20 mM de Tris pH 8, 0, 25 mM de imidazol y 300 mM de cloruro de sodio. La proteína His-Tag fue eluida de la resina utilizando un amortiguador conteniendo 20 mM Tris pH 8, 0, 300 mM imidazol y 300 mM de doruro de sodio. Una resina de intercambio de catión de sefarosa CM se utiliza para purificar adicionalmente la proteína en 20 mM de fosfato de sodio (pH 7.0), y la fracción no unida que contiene la proteína objetivo se recolecta. La proteína se amortigua intercambiando PBS o 10 mMde HEPES, pH 7.4, más 150 mM de cloruro de sodio al dializar y concentrar a 0.21 mg/mL con una pureza final > 90%, se juzga por teñido gel SDS PAGE con azul Comassie. La proteína ALK-1 ECD His-Tag fue glicosilada pesadamente con un PM aparente de 26 KDa, comparado con un PM teórico de 11 para la proteína. La proteína ALK -1 ECD His- Tag (SEQ ID NO: 98) ha sido utilizada para la generación de hibridomas productores de anticuerpo anti-ALK-1 como se describe en el Ejemplo 2.

Proteína ALK-1 ECD His-Tag Humana:

secuencia de gen (la parte en minúsculas es la señal de secreción):

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccGACCCTGTGAAGC
CGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGG
GGGGCCTGGTGCACAGTAGTGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCT
GCGGGAACTTGCACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGC
GACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCCTTCGGAGCAG
CCGGGAACAGATGGCCAGCATCATCATCATCATCAT (SEQ ID NO: 99)

secuencia de proteína:

DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHY
CCDSHLCNHNVSLVLEATQPPSEQPGTDGQHHHHHH (SEQ ID NO: 98)

Ejemplo 2. Generación de Hibridomas que Producen Anticuervo Anti-ALK-1

~~190~~ 191
175

Se inmunizan ratones XEROMOUSE® con edades de ocho a diez semanas en sus patas traseras con 10 µg/ ratón de ya sea quimera humana recombinante ALK-1 ECD (R & D Systems, Inc., Número de Catálogo 370-AL) o con la proteína ALK-1 ECD His-Tag descrita en el Ejemplo 1. Esta dosis se repite cinco a siete veces por sobre un período de tres a cinco semanas. Tres o cuatro días antes de la fusión, a los ratones les fue dada una inyección final del inmunógeno en PBS. Los linfocitos en nódulo linfático procedentes de los ratones inmunizados fueron fusionados con la mieloma de la línea celular no secretada P3-X63-Ag8.653 vía electrofusión de la célula (ATCCC Cat No. CRL 1580), y estas células fusionadas fueron sometidas a selección HA-DMEM como descrito previamente (DMEM/15%FBS/1 %200 mM L-glutamina/1 % 100X aminoácidos no esenciales/1% 100X Pen/Strip/10U/ml IL-61 ampolla/litro OPI medio de suplemento más 0, 5x HA (Azaserina-Hipozantina, Sigma, Cat. # A9666)). Fue recuperado un panel de hibridomas que secretaban todos los anticuerpos específicos humanos ALK-1 IgG2.

La prueba ELISA fue utilizada para detectar la unión anticuerpo. El inmunogen fue revestido en la placa de microvaloración Immulon de 96 pozos (NUNC-Immuno™ superficie de placa MaxiSorpTM, Nalge Nunc Internacional, Cato No. 439454) a 4 µlg/mL en 50 mM de amortiguador de bicarbonato de sodio durante toda la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas, y luego bloqueadas con PBS con la adición de 0, 1% de Tween-20 y 0, 5% de albúmina de suero bovino. Fueron agregados los anticuerpos a las placas ELISA bloqueadas, incubados por 1 hora, y lavados con PBS con Tween-20. La unión fue detectada mediante peroxidas de rábano IgG anti-humana (Pierce, No. de Catálogo 31420) seguido por la adición de ABTS (Pierce, No. de Catálogo 37615). Se desarrollan

mediciones colorimétricas a 405 nm en un lector de microplaca (SpectraMax Plus 384, Dispositivos Moleculares).

Se seleccionan veinticinco hibridomas para estudio adicional. Estas son células simples clonadas mediante dilución limitada y se designa 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

Se deposita la línea Célula de Hibridoma de Ratón LN 15916 (el hibridoma 1.12.1) bajo los términos de acuerdo con el American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 el 21 de Junio de 2005. El hibridoma 1.12.1 ha sido asignado con el siguiente número de acceso: TA-6008.

Ejemplo 3. Secuencias de Anticuerpos Anti-ALK-1

Para analizar la estructura de los anticuerpos producidos de acuerdo con la invención, se clonan los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de cadena pesada y cadena liviana a partir de los hibridomas que producen los anticuerpos anti-ALK-1 monoclonales. El clonado y las secuencias se logran por medios estándares.

Se aísla Poli(A)+rnARN utilizando un kit Fast- Track™ (Invitrogen) de aproximadamente 2 x 105 células de hibridomas para cada uno de los anticuerpos ALK-1. Fue sintetizado cADN a partir del rnARN utilizando cebadores aleatorios. El

cADN cebado aleatorio se amplifica mediante PCR utilizando cebadores de dominio variable específicos de la familia V_H humana o V_L humana en conjunto con cebadores específicos para la región constante $C_\gamma 2$ humana o una región constante C_K para amplificar la región variable del anticuerpo incluyendo todas las regiones de estructura (FRs) y determinando la complementariedad las regiones (CDRs). Fueron obtenidas secuencias de ácido nucleico que codifican los transcriptos de cadena pesada y cadena liviana kappa de los hibridomas que producen anti-ALK-1 por medio del secuenciado tanto de ambas hebras de productos PCR. Las secuencias fueron analizadas utilizando el software propiedad de Aggenix y la información de secuencia públicamente disponible para los genes humanos V_H y V_k, el "directorio de secuencias V BASE", Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambride, UK). Resultados idénticos pudieran ser obtenidos por alguien medianamente experto utilizando el software de alineamiento de secuencia disponible públicamente utilizando los programas de software MacVector y Geneworks.

Específicamente, el anticuerpo ALK-1 de longitud completa 1.12.1 se clona dentro de los vectores de expresión como sigue: Poli(A)+rnARN fue aislado utilizando un kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) y sintetizado por cADN a partir del rnARN con el kit Advantage RT-para-PCR (BD Biosciences) utilizando cebador oligo(dT). El cADN oligo(dT) cebado para clonar 1.12.1 fue amplificado utilizando los cebadores listados en la Tabla 2. La amplificación fue lograda cuando la polimerasa Pfu Ultra (Stratagene) y un PTC-200 DNA Engine (MJ Research) con ciclado como sigue: 3' @ 95°C; 25x (20" @ 95°C, 30" @ 52°C, 1 '20" @ 72°C); 10' @ 72°C. Los clones fueron verificados por secuencia utilizando química Grills 16a BDTv3.1/dGTP (Applicd Biosystems Inc.) y un Analizador de ADN 3730xl (Applicd Biosystems Inc.). En el proceso de clonado de 1.12.1 V_H, fue introducida una

mutación silente en el codón 8°, convirtiendo "GGC" a "GGT." Todas las secuencias fueron analizadas mediante alineaciones al "directorio de secuencias V BASE" (Tomlinson et al., *J. Mol. Bio.*, 227, 776-798 (1992); *Hum. Mal. Genet.*, 3, 853-860 (1994); *EMBO J.*, 4628-4638 (1995).)

Tabla 2

Cebadores de Amplificación de Cadena Pesada y Liviana para el Clonado de 1.12.1 de Longitud Completa

Nombre del Cebador	Secuencia del Cebador	SEQ ID NO
4-61	5' tcttcaagcttgatatctctagaagccgccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCC 3'	105
G1/2_FL_R	5' ttctctgatcagaattcctaCTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC 3'	106
A11	5' tcttcaagcttcccgggagccgccaccATGGAAACCCCAGCGCAGCTT 3'	107
K_FL_R	5' ttctttgatcagaattctcaCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG 3'	108

Bases no hibridantes en minúsculas.

Ejemplo 4. Análisis de Utilización del Gen v Análisis CDR

A partir de la secuencia de ácido nudeico y la secuencia de aminoácido predicha de los anticuerpos, el uso del gen fue identificado para cada cadena de anticuerpos. La Tabla 3 establece la utilización del gen de clones de hibridomas seleccionados de los anticuerpos de acuerdo con la invención.

Tabla 3

Utilización de los Genes de Cadena Pesada y Liviana

Clon	Línea Germinal de Cadena Pesada				Línea Germinal de Cadena Liviana Kappa		
	SEQ ID NO:	V_H	D_H	J_H	SEQ ID NO:	V_K	J_K
1.11.1	9	3-33	6-19	JH3B	11	L1	JK4
1.12.1	103	4-31	6-19	JH4B	126	A27	JK5
1.13.1	13	4-61	6-19	JH4B	15	A27	JK5
1.14.1	17	4-61	6-19	JH4B	19	A27	JK5
1.151.1	21	4-31	3-3	JH3B	23	B3	JK1
1.162.1	25	4-31		JH3B	27	A27	JK5
1.183.1	29	4-59	6-19	JH4B	31	L2	JK3
1.31.1		4-31	6-19	JH4B		A27	JK5
1.8.1	33	4-31	3-3	JH3B	35	B3	JK1
1.9.1	37	3-11	3-22	JH6B	39	A2	JK1
4.10.1	41	3-15	3-22	JH4B	43	A3	JK4
4.24.1	45	4-31	5-12	JH6B	47	A27	JK5
4.38.1	49	4-31	4-23	JH4B	51	B3	JK1
4.58.1	53	4-31	4-23	JH4B	55	A27	JK5
4.62.1	57	4-31	5-12	JH6B	59	A27	JK5
4.68.1	61	4-31	2-2	JH5B	63	A27	JK5
4.72.1	65	4-31	5-12	JH6B	67	A27	JK5
5.13.1	69	4-31		JH3B	71	A27	JK4
5.34.1	73	4-31		JH6B	75	A1	JK1
5.53.1	77	3-15	1-1	JH4B	79	B2	JK4
5.56.1	81	3-11	6-19	JH6B	83	A2	JK1
5.57.1	85	3-11	3-10	JH6B	87	A2	JK1
5.59.1	89	3-11	6-6	JH6B	91	A2	JK1

Se conduce una mutagénesis en las regiones V_H (M29I) y VK (D 19A) del clon 1.12.1 con los cebadores listados en la Tabla 4 y el kit Quick Change (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las variantes mutadas se secuencian verificadas y clonadas en vectores de expresión por medio de procedimientos estándares.

Tabla 4

Oligonucleótidos Mutagénicos (secuencias 5' a 3')

Cebador	Codificante	Anticodificante
1.12.1(D19A)	CTCCAGGGGAAAGAG**C**CACCCTCTCCTGTAGG (SEQ ID NO: 109)	CCTACAGGAGAGGGTG**G**CTCTTTCCCCTGGAG (SEQ ID NO: 110)
1.12.1(M29I)	GGTGGCTCCAT**C**AGCAGTGGTGAATACTAC (SEQ ID NO: 111)	GTAGTATTCACCACTGCT**G**ATGGAGCCACC (SEQ ID NO: 112)

Las mutaciones están indicadas en negrita y subrayadas.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 5) y el dominio variable de la cadena liviana (SEQ ID NO: 7) cadena del anticuerpo 1.12.1(M29I/D19A) fueron depositadas bajo los términos de acuerdo con el Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 en el 14 de Julio de 2005. A los depósitos les han sido asignados los siguientes números de acceso: ATCC No. PTA-6864 para la *E. coli* D_H5a que contiene el plásmido pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_H (M29I):UC 25502; y ATCC No. PTA-6865 para la *E. coli* OH5a que contiene el plásmido pCR2.1 TOPO 1.12.1 VK(019A):UC 25503.

Un número de anticuerpos anti-ALK-1 humanos específicos exhibe un patrón común en CDR1 del dominio variable de cadena pesada. Estas moléculas delanteras utilizan los segmentos 4-31 o 4.61 de gen V. Las secuencias FR1 y CDR1 correspondientes a estas cadenas pesadas del anticuerpo están mostradas en la Tabla 4A, alineadas contra las secuencias de la línea germinal. Un guión (-) en la alineación indica un residuo idéntico a la línea germinal. En todos los casos, el patrón GYYWS (SEQ. ID NO: 136) al final del CDR1 ha pasado a través de mutaciones somáticas para producir un nuevo patrón de secuencia, por lo que el residuo G es cambiado a un residuo acídico (D o E), y el residuo S final es cambiado a un N en 9 de los 12 ejemplos. La diversidad de secuencias en otras regiones de V_H indica que es muy probable que sean eventos de mutación

somática independientes que conducen al mismo patrón de secuencia al final del CDR de VH.

Tabla 4A

Patrones de Secuencia de la Cadena Pesada del Anticuerpo ALK-1

Clon	V-gen	D-gen	J-gen	FR1	CDR1
				QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS (SEQ ID NO: 122)	GGSISSGGYYWS (SEQ ID NO: 123)
	Germline				
5.34.1	VH4-31	- NA -	JH6B	----------	-------D---N
4.58.1	VH4-31	D4-23	JH4B	----------	-------D---N
4.38.1	VH4-31	D4-23	JH4B	----------	-------D----
5.13.1	VH4-31	- NA -	JH3B	----------	-------D---N
1.162.1	VH4-31	- NA -	JH3B	----------I----	-------E----
4.72.1	VH4-31	D5-12	JH6B	----------	-------E----
4.24.1	VH4-31	D5-12	JH6B	----------	-------ND---N
4.62.1	VH4-31	D5-12	JH6B	----------	-------D---N
1.31.1	VH4-31	D6-19	JH4B	----------	-------D---N
1.12.1	VH4-31	D6-19	JH4B	----------	---M---E---N
				QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO: 124)	GGSVSSGGYYWS (SEQ ID NO: 125)
	Germline				
1.13.1	VH4-61	D6-19	JH4B	--H----------	-------D---N
1.14.1	VH4-61	D6-19	JH4B	----------	-------D---N

Ejemplo 5. Preparación de las Moléculas 1.12.1

El fragmento Fab de 1.12.1(M29I/D19A) fue preparado mediante la digestión de 1.12.1(M29I/D19A) IgG1 utilizando papaína. Fue incubada la proteína A 1.12.1(M29I/D19A) IgG1 longitud completa con papaína (VWR) en una proporción de 1:50 (papaína/proteína) en un amortiguador conteniendo 30 mM de fosfato de sodio (pH 7, 0), 2 mM de EDTA y 2 mM de cisteína a 37°C por 2-3 horas. La mezcla de digestión fue aplicada entonces a mini-columna de proteína A para remover la proteína de longitud completa y el fragmento Fc no digeridos. Se recolecta el Fab no unido en flujo. Fue utilizada entonces una columna de exclusión de tamaño (Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) para purificar

aún más la proteína Fab y para intercambiar el amortiguador en PBS. Se remueve la endotxina mediante la aplicación de la solución de proteína a través de gel Detoxi (PIERCE) y posteriormente la columna de intercambio de ion Vivapure Mini Q (VivaScience). La proteína se filtra con un filtro de jeringa de 0, 2 /lm y el nivel de endotoxina se prueba con un kit LAL pirogent (Cambrex). La proteína final purificada estaba a una concentración de 2-3 mg/mL, con un nivel de endotoxina de <0, 1 EU/mg y una pureza de >95%. El fragmento Fab 1.12.1 (M29I/D19A) tiene un peso molecular de 47.347 bajo condición no reducida tal como se muestra mediante la espectrometría de masa con rociado de electrones. El análisis de secuencia Edman terminal N confirmó la secuencia de cadena liviana de terminal N EIVLTQSPG (SEQ ID NO: 113) y la secuencia de cadena pesada de QVQLQSESG (SEQ ID NO: 114), respectivamente.

Ejemplo 6. Determinación de los Valores de Avidez de los Anticueroos Anti-ALK-1 Monoclonales Completamente humanos Mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) Usando BIACORE™

Se desarrollan las mediciones de avidez de los anticuerpos anti-ALK-1 purificados mediante resonancia de Plasmón de superficie utilizando el instrumento BIACORE™ 3000 como sigue utilizando los protocolos del fabricante.

Para desarrollar los análisis cinéticos, se inmovilizan proteína de fusión ALK-1 recombinante humana (hALK-1/Fc) y proteína de fusión ALK-1 cinomóloga (cALK-1/Fc) en celdas de flujo separadas de un sensor chip CM5 BIAcore utilizando acoplamiento de rutina de amina. Las superficies se preparan utilizando 10 mM de amortiguador de acetato, pH 5, 0 como el amortiguador de inmovilización y se logran densidades de proteína para las proteínas de fusión de

300 y 150 RU para el hALK-1/ Fc y cALK-1/Fc, respectivamente. La desactivación de los ésteres N-hidroxisuccinimida no reactivos se desarrolla utilizando 1 m de clorhidrato de etanolamina, pH 8, 5. Las muestras de anticuerpo en amortiguador corriente se preparan en concentraciones que variaban desde 0, 125 hasta 2nM (una solución de 0 nM consistiendo de amortiguador de serie que sólo incluye como una referencia cero). Las muestras fueron aleatorizadas e inyectadas por duplicado durante 10 minutos cada una a través de todas las 4 celdas de flujo utilizando HBS-EP (10 mM de HEPES pH 7, 4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, 0, 005% de Tensoactivo P20) como el amortiguador corriente. Se observó que los regímenes de conexión (On) eran independientes de las proporciones de flujo desde 1 hasta 100 µL/min indicando transporte de masa limitado. Una proporción de flujo de 25 /lL/min fue usado para determinar los valores de avidez. La disociación del anticuerpo fue monitoreada durante 10 minutos, la superficie regenerada mediante una se'gunda inyección de 12 segundos de 100 mM H3P04 (25 /lL/min). Los datos crudos fueron procesados utilizando el paquete de software Scrubber (©BioLogic Software) y analizados utilizando el paquete de software CLAMP (©BioLogic Software). Múltiples juegos de datos procedentes desde una superficie simple, seis juegos de datos al mismo tiempo, fueron ajustados simultáneamente globalmente a un simple modelo de unión 1: 1 Langmuir utilizando un valor variable Rmax. La Tabla 5 lista valores de avidez para los anticuerpos anti-ALK-1 representativos de la presente invención. Los datos representados indican que los anticuerpos preparados de acuerdo con la invención poseen altas afinidades y constante de unión fuerte para el ALK-1 humano.

Tabla 5

184

Determinación del Valor de Avidez Mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (BIAcore)

Clon	hALK-1/Fc Avidez(pM)	hALK-1/Fc k_{dis}(1/s)	cALK-1/Fc Avidez (pM)
1.12.1(M29I/D19A)	<6.8	$<5.0 \times 10^{-6}$	27
1.14.2	76	5.6×10^{-5}	280
1.27.3	2.9	1.9×10^{-5}	60
1.31.1	<13	$<5.0 \times 10^{-6}$	150
1.162.1	18	1.1×10^{-5}	62
1.183.2	220	3.1×10^{-5}	1800
4.24.2	70	4.4×10^{-5}	430
4.38.1	100	4.0×10^{-5}	150
4.58.2	40	1.6×10^{-5}	130
4.62.1	9.6	7.6×10^{-6}	19
4.68.2	86	3.8×10^{-5}	320
4.72.2	73	3.4×10^{-5}	280
5.13.3	91	6.3×10^{-5}	190

1.12.1 (M29I/D19A) se refiere a la variante 1.12.1 que se expresa recombinante mAb conteniendo dos mutaciones de aminoácidos específicas (metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina y ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanita).

Ejemplo 7. Determinación de las Constantes de Afinidad (KD) de las Variantes del Anticuerpo Anti-ALK-1 Monoclonal completamente humano 1.12.1 Mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) Usando BIACORETM

Se desarrollan las mediciones de afinidad de los anticuerpos anti-ALK-1 purificados mediante resonancia de superficie de plasmón utilizando el instrumento BIACORE™ 3000 como sigue utilizando los protocolos del fabricante.

Para desarrollar los análisis cinéticos, variantes del anticuerpo anti-ALK-1 monoclonal completamente humano se inmovilizan sobre la capa dextrano de un biosensor chipCM5 BIAcore utilizando acoplamiento de amina. Las superficies se preparan utilizando 10 mM de amortiguador de acetato, pH 5, 0 como el amortiguador de inmovilización y se logran densidades de proteína de 3500-4800 RU. La desactivación de los ésteres N-hidroxisuccinimida no reactivos se desarrollan utilizando 1 M de clorhidrato de etanolamina, pH 8, 5. Las muestras de ALK-ECD en amortiguador corriente se preparan en concentraciones que varían desde 2, 63 hasta 640 nM (una solución de 0 nM que comprende amortiguador corriente sólo fue preparada como referencia cero). Las muestras fueron aleatorizadas e inyectadas durante 2 minutos cada una a través de todas las 4 celdas de flujo utilizando HBS-EP (10 mM de HEPES pH 7, 4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, 0, 005% de Tensoactivo P20) como el amortiguador corriente. Una proporción de flujo de 25 µL/min fue usado para determinar los valores de afinidad. La disociación del ALK-ECD fue monitoreada durante 10 minutos, la superficie regenerada mediante una segunda inyección de 12 segundos de 100 mM H3P04 (25 µL/min). Los datos crudos fueron procesados utilizando el paquete de software Scrubber (©BioLogic Software) y analizados utilizando el paquete de software CLAMP (©BioLogic Software). Los datos fueron ajustados globalmente a un simple modelo de unión 1: 1 Langmuir. La Tabla 6 lista las mediciones de afinidad para las variantes del anticuerpo anti-ALK-1 monoclonal humano.

Tabla 6

Determinación de la constante K_D de afinidad variante de mAb 1.12.1 (KD mediante resonancia de plasmón de superficie (BIAcore)

186

Anticuerpo	Proporción on ($M^{-1} s^{-1}$)	Proporción dis (s^{-1})	K_D (nM)
1.12.1	1.9×10^{3}	7.4×10^{-5}	39
1.12.1(rWT)	2.2×10^{3}	5.8×10^{-5}	26
1.12.1(D19A)	2.6×10^{3}	4.4×10^{-5}	17
1.12.1(M29I)	2.4×10^{3}	9.1×10^{-5}	38
1.12.1(M29I/D19A) (1)*	2.2×10^{3}	9.5×10^{-5}	43
1.12.1(M29I/D19A) (2)*	2.3×10^{3}	8.4×10^{-5}	37

* Las dos constantes de afinidad para 1.12.1(M29I/D19A) (1) y (2) obtenidas utilizando dos superficies separadas.

1.12.1 se refiere a la variante mAb que se aísla de hibridoma.

1.12.1(rWT) se refiere a la variante mAb que era mAb recombinante expresado.

1.12.1(M29I) se refiere a la variante mAb que era mAb recombinante expresada conteniendo una mutación de aminoácido simple específica en donde la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina.

1.12.1(D19A) se refiere a la variante mAb que era mAb recombinante expresada conteniendo una mutación de aminoácido simple específica en donde la metionina en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina.

1.12.1(M29I/D19A) se refiere a la variante mAb que era mAb recombinante expresada conteniendo dos mutaciones de aminoácidos específicas (la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina y el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina).

187

Ejemplo 8. Determinación de las Constantes de Afinidad (KD) Anticuerpos Anti-ALK-1 Monoclonales Totalmente humanos Mediante Resonancia de Plasmón Superficie (SPR) utilizando BIACORE™

Se desarrollan mediciones de afinidad (K_D y K_{dis}) de anticuerpos anti-ALK-1 purificados mediante resonancia de superficie de plasmón utilizando el instrumento BIACORE™ 3000 como sigue utilizando los protocolos del fabricante.

Para desarrollar los análisis cinéticos, mAbs purificados por afinidad se inmovilizan sobre la capa dextrano de in biosensor chip CM5 utilizando acoplamiento de amina. Las superficies se preparan utilizando 10 mM de amortiguador de acetato, pH 5, 0 como el amortiguador de inmovilización y se logran densidades de proteína de 200-400 RU. La desactivación de los ésteres N-hidroxisuccinimida no reactivos se desarrollab utilizando 1 M de clorhidrato de etanolamina, pH 8, 5. Las muestras de ALK-ECD en amortiguador corriente se preparan en concentraciones que variaban desde 3, 125-400 nM (una solución de 0 nM consistiendo de amortiguador corriente sólo fue preparada como referencia cero). Las muestras se aleatorizan e inyectan durante 2 minutos cada una a través de todas las 4 celdas de flujo utilizando HBS- EP (10 mM de HEPES pH 7, 4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, 0, 005% de Tensoactivo P20) como el amortiguador corriente. La disociación del ALK-ECD monomérico fue monitoreada durante 10 minutos, la superficie regenerada mediante una segunda inyección de 12 segundos de 100 mM H_3PO_4 (25 µL/min). Los datos crudos fueron procesados utilizando el paquete de software Scrubber (©BioLogic Software) y analizados utilizando el paquete de software CLAMP (©BioLogic Software). Los datos fueron ajustados globalmente a un simple modelo de unión 1: 1 Langmuir. La Tabla 7 lista

las mediciones de afinidad para los anticuerpos anti-ALK-1 representativos de la presente invención.

Tabla 7

Determinación de la Constante de Afinidad ara los Anticueroos Monoclonales Representativos Mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (BIAcore)

mAb	Proporción on (M^{-1} s^{-1})	Proporción dis (s^{-1})	K_D (nM)
1.12.1(M29I/D19A)	3.3×10^4	8.2×10^{-4}	25
1.31.1	3.2×10^4	1.9×10^{-4}	6.0
4.72.1	3.2×10^4	2.5×10^{-5}	0.8
Fab 1.12.1(M29I/D19A)	3.8×10^4	8.2×10^{-4}	22

Los ALK-ECD usados para generar los datos en el Ejemplo 8 tuvieron una preparación diferente a la utilizada para generar los datos en el Ejemplo 7.

1.12.1(M29I/D19A) se refiere a la variante 1.12.1 que era mAb recombinante expresada conteniendo dos mutaciones de aminoácidos específicas mencionadas anteriormente (ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina y metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina).

Fab 1.12.1(M29I/D19A) se refiere al fragmento Fab de mAb a la variante mAb 1.12.1(M29I/D19A) preparada mediante digestión del 1.12.1(M29I/D19A) IgG 1 utilizando papaína

189

Ejemplo 9. Identificación de la Selectividad de Epítopo de los AnticuerDos Anti-ALK-1

Se desarrollan experimentos de competencia cruzada utilizando el instrumento BIACORE™ 3000 (Biocore International AB, Uppsdale, Sweeden y Piscataway, N. J.), siguiendo los protocolos del fabricante.

Se inmoviliza quimera ALK-1/FC humana recombinante sobre la capa dextrano de una los bosensores chip CM5 utilizando acoplamiento de amina. Los chips se preparan utilizando 10 mM de amortiguador de acetato, pH 5, 0 como el amortiguador de inmovilización y fue lograda una densidad de proteína de 940 RU. La desactivación de los ésteres N-hidroxisuccinimida no reacctivos se desarrolla utilizando 1 M de clorhidrato de etanolamina, pH 8, 5.

Los mAbs fueron diluidos a una concentración de 50 nM en amortiguador corriente HBS.EP (0, 01 M de HEPES pH 7, 4, 0, 15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0, 005% de Tensoactivo P20). Fue seleccionado un anticuerpo primario inyectado a través de la celda de flujo por 600 segundos a una proporción de 10 µL/min. Después que la inyección estaba terminada, fue seleccionado un anticuerpo secundario e inyectado a través de la misma celda de flujo por 600 segundos a una proporción de 10 µL/min. La superficie detectora fue regenerada mediante una segunda inyección de 12 segundos de 100 mM H_3PO_4 (25 µL/min).

Después de la regeneración, el anticuerpo primario fue inyectado de nuevo a través de la celda de flujo por 600 segundos a una proporción de 10 /IL/min. Después que la inyección estaba terminada, fue seleccionado un anticuerpo secundario diferente e inyectado a través de la misma celda de flujo por 600

segundos a una proporción de 10 µL/min. Una vez que todo el panel de 14 anticuerpos había sido usado como el anticuerpo secundario, fue seleccionado un nuevo anticuerpo primario y el procedimiento repetido con el nuevo anticuerpo primario. Estos procedimientos fueron llevados a cabo hasta que todas las combinaciones posibles de anticuerpos primario y secundario habían sido inyectadas a través de la celda de flujo. la unión del anticuerpo secundario fue considerado a haber ocurrido como sí la respuesta total observada después de inyectar ambos anticuerpos excedió aquella observada para ambos valores de dintel posibles. Los valores de dintel fueron determinados utilizando el mismo anticuerpo como el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario. Mostrado en la Tabla 8, fue creada una matriz de respuesta en base a sí la unión fue observado: - indica ningún aglutinamiento del anticuerpo secundario, x indica que fue observada unión (la respuesta fue más grande que los valores de dintel para los anticuerpos individuales). El agrupamiento de los clones que muestran el mismo patrón de reactividad da origen a dos enlaces de epítopos diferentes con 1.11.1 en un recipiente y los demás anticuerpos en el otro recipiente.

Tabla 8: Matriz de respuesta de "binning" de epítopo BIAcore.

191

mAB primario	mAB secundario													
	1.9.1	1.11.1	1.12.1(M29I/D19A)	1.27.3	1.31.1	1.162.1	1.183.2	4.24.2	4.38.1	4.58.2	4.62.1	4.68.2	4.72	5.
1.9.1		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.11.1	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1.12.1(M29I/D19A)	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.27.3	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.31.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.162.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.183.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.24.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.38.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.58.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.62.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.68.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.72	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.13	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ejemplo 10. Aislamiento de Gen ALK-1 de Mono Cynomolgus

Se extrae gen ALK -1 de mono cinómologo ("Cyno") desde el tejido de pulmón Cyno. Basado en la secuencia de gen publicada para el ALK-1 humano (registro del Genebank L17075), fueron diseñados cebadores para que el PVR amplificara el Cynomolgus ALK-1 de longitud completa. Fue preparado mARN a partir de tejido congelado de pulmón de cynomolgus (ca.1 gramo) utilizando el kit de purificación mARN (Ambion, No. Catálogo 1915) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 200 ng del mARN fueron transcritos en reverso y el PCR amplificado utilizando el kit OneStep RT-PCR (Qiagen, Catálogo No. 210210) utilizando los oligos específicos de gen: 5'-AGCGGGCCCAGAGGGACCATG (SEQ ID NO: 115) (hacia delante) y 5' CAGAAAGGAATCAGGTGCTCCTGGGCTA (SEQ ID NO: 116 (inversa) a una temperatura de templado de 61°C. Un producto RT-PCR del tamaño apropiado (-1, 5 Kb) se extrae y purificado desde un gel de agarosa después de la electroforesis, luego el TOPO-TA se clona al vector pCR4-TOPO (Invitrogen, No. Catálogo K4575-01). El engaste fue secuenciado para

192

obtener la secuencia nucleótido ORF del ALK-1 Cynomolgus. El nucleótido y las secuencia de nucleótidos predichas están mostradas en la SEQ ID NOs: 93 y 94, respectivamente. Aunque la porción citoplásmica del gen codifica secuencias de proteína idénticas entre el Cyno y humano, existen 5 diferencias aminoácidos en el dominio extracelular (ECD, que incluye la posiciones 22-118) y 1 diferencia de aminoácido en el dominio transmembrana de la proteína. La identidad de secuencia ECD entre el humano y el Cyno es de 94, 8%. Una alineación del ECD humano y el primate está mostrada en la Figura 2.

Un par de cebadores (con dirección a: 5'-GATT**ATG**GCCTTGGGCTCCCCCAGGAAA (SEQ ID NO: 117) e inversa: 5'-GGG**CTA**TTGAATCACTTTAGGCTTCTCTGGACTGTTG (SEQ ID NO: 118) se utilizan para amplificar por PCR el gen ALK-1 Cynomologus de longitud completa.

Ejemplo 11. Determinación de las Características de Unión de Superficie de Célula y Hibridación cruzada por citometría de flujo

Para generar las líneas celulares que sobre-expresan ALK-1, que pueden ser utilizadas para probar la afinidad de unión del anti-ALK-1 utilizando citometría de flujo (FACS), genes humanos, Cyno y de rata ALK-1 de longitud completa fueron clonados en el vector de Invitrogen (Catálogo No. K6510-20) pcDNA5/FRT/To TOPO y transfectados en célula anfitriona Flp-In-T-Rex (Invitrogen, Catálogo No. R780-07), respectivamente. Las selecciones fueron llevadas a cabo utilizando higromicina para obtener líneas celulares estables finales. La sobre-expresión de las respectivas proteínas ALK-1 de longitud completa fue lograda mediante la inducción de tatraciclina (2IIgjmL) a 37°Cj5% C02 por 24 horas.

193

Se prueban anti-ALK-1 mAbs en sus afinidades de unión a la superficie celular ALK-1 utilizando el ensayo FACS, empleando 293 células estables que sobre-expresaban las proteínas ALK-1. Las células fueron desprendidas utilizando tripsin-EDTA y lavadas con PBS-SA frío. Después de ser divididas en alícuotas dentro de las placas de 96 pozos, las células fueron bloqueadas con suero e incubadas con diferentes concentraciones de mAb especifico por 1 hora a 4°C. Subsecuentemente, las células fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario K anti-Humano conjugado con fluoroforo R-PE antes de ser analizadas utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Fueron recogidos 10.000 eventos por cada muestra sin la aplicación de ninguna conmutación electrónica. Mostrado en la Tabla 9, fue trazada la media geométrica de cada histograma de muestra como una función de la concentración de mAb y la KD fue calculada para cada mAb después de la adaptación a un modelo de equilibrio de dos estados. Ejemplos de experimentos equivalentes FACS con humanos y primate s están mostrados en la Figura 3.

Tabla 9

Resultados de la Afinidad Media de Unión (K) de Anticuerpos Anti-ALK-1 Monoclonales a la superficie celular ALK-1 Humana o Cyno Medida

194

Anticuerpo	K_D (nM)	
	Humano	Cyno
1.12.1	6.7	2.0
1.27.1	3.7	2.2
1.162.1	5.6	3.0
4.38.1	9.3	3.4
4.58.1	14.0	6.7
4.72.1	6.4	3.8
5.13.1	3.2	1.6
1.31.1	3.2	1.7
4.24.1	7.6	3.1
4.62.1	2.3	0.78
4.68.1	8.4	9.0

En adición, fue mostrado que la 1.12.1, por medio del ensayo F ACS, tiene un cruce muy limitado para la rata (KD> 100 nM) y se predijo que tiene un cruce muy bajo para el ratón en vista de la identidad de secuencia del 74% y 66% entre el ALK-1 de rata/Humano y ratón/Humano, respectivamente.

El ensayo FACS fue utilizado también para determinar el K_D de las variantes de 1.12.1 mAb recombinante. Mostrados en la Tabla 10, los resultados indican una afinidad de unión similar a partir del anticuerpo recombinante.

Tabla 10

Resultados de la Afinidad Media de Unión (K_D) de variantes 1.12 (M29I/D19A) superficie celular humana o Cyno ALK-1 medido por FACS

195

210
211

Anticuerpo	K_D (nM)	
	Humano	Cyno
1.12.1	6.7	2.0
1.12.1(rWT)	5.9	6.0
1.12.1(M29I)	6.0	3.3
1.12.1(D19A)	5.7	3.8
1.12.1(M29I/D19A)	7.2	3.4
Fab 1.12.1(M29I/D19A)	0.77	ND

1.12.1 se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se aísla del hibridoma.

1.12.1(rWT) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante.

1.12.1(M29I) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica en donde la metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina.

1.12.1(D19A) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante que contiene una mutación de aminoácido simple específica en donde el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana se reemplaza con alanina.

1.12.1(M29I/D19A) se refiere a la variante 1.12.1 mAb que se expresa mAB recombinante que contiene dos mutaciones de aminoácidos específicas (metionina en la posición 29 en la cadena pesada se reemplaza con isoleucina y el ácido aspártico en la posición 19 en la cadena liviana reemplazado con alanina).

Fab 1.12.1 (M29I/D 19A) se refiere al fragmento de mAb 1.12. I(M29I/DI9A) preparado al digerir 1.12.1(M29I/DI9A) IgG 1 utilizando papaína.

Ejemplo 12. Ensavo Tagman para Id1

Se seleccionan HUVECs (Blowhittaker, Cat. # CC-2519) sobre placas de 24 pozos, 1200 células/pozo en 600 µL de medio HUVEC completo (kit EGM-2 Bullet, Blowhittaker, Cat. # CC-3162), y dejados desarrollar durante toda la noche. Al día siguiente las células eran 50% co-fluentes típicamente. El medio completo fue removido y fueron agregados 200 µL de Starvation Medium (EBM-2 con 0, 2% FBS solamente). Las células fueron incubadas por 2 horas. Luego, las células fueron tratadas con 40 µL de solución anticuerpo en PBS. Ab liofilado fue reconstituido con PBS estéril. Finalmente, las células fueron tratadas con medio al 1% FBS/Basal (concentraciones finales) por 30 minutos, el medio fue removido y las células fueron lavadas en 40 µL de amortiguador RTL Buffer (kit Rneasy 96, Qiagen, Cat. # 74182), de acuerdo con los protocolos del fabricante. Subsecuentemente, el ARN fue preparado utilizando el kit RNeasy (de acuerdo a las instrucciones del fabricante). El ARN se eluye y cuantifica con el kit RiboGreen@ ARN Quantification Kit (Sondas moleculares, Cat. # R-11490). Se utiliza una cantidad igual total de ARN para el análisis PCR en tiempo real para detectar la expresión Id1 ARN (instrumento ABI 7900). El PCR fue conducido utilizando el kit Tagman One Step PCR Master Mix Kit (ABI, Cat. # 4309169) y el cebador ID1/secuencias e Sonda listadas adelante. El PCR fue conducido utilizando 40 ciclos de las siguientes condiciones de recocido y amplificación: 95°C, 15 segundos; 60°C, 1 minuto.

Sonda Tagman: CPG-conjugado 5'-6-FAM, y 3?-TAMRA.

Nombre: ID1 Probe

Secuencia: 5' CCAGCACGTCATCGACTACATCAGGGA 3' (SEQ ID NO: 119) Cebadores PCR Tagman:

Nombre: ID1-F

Secuencia: 5' AAGGTGAGCAAGGTGGAGATTC 3' (SEQ ID NO: 120)

Nombre: ID1-R

Secuencia: 5' TICCGAGTICAGCTCCAACTG 3' (SEQ ID NO: 121)

Ejemplos de titulaciones para la molécula delantera 1.12.1(M29I/DI9A) Id1 (incluyendo las variantes de la secuencia 1.12.1) y el derivado Fab están mostrados en las Figuras 4 y 5.

Un resumen de valores medios IC_{50} para este ensayo está mostrado en la Tabla 11. Todas las determinaciones de IC_{50} fueron corridas por triplicado.

Ejemplo 13. Fosforilación Smad1 Detectada Mediante el Sistema de Formación de Imagen Infrarroja Odyssey de LI-COR Biosciences (24 placas por pozo)

Se seleccionan HUVECs (Blowhittaker, Cat. # CC-2519) sobre placas de 24 pozos, 1200 células/pozo en 600 µL de medio HUVEC completo (kit EGM-2 Bullet, Blowhittaker, Cat. # CC-3162), y dejados crecer durante toda la noche. Al día siguiente las células eran 50% co-fluentes típicamente. El medio completo fue removido y fueron agregados 200 µL de Starvatio Médium (EBM-2 con 0, 2% FBS solamente). Las células fueron incubadas por 2 horas. Luego, las células fueron tratadas con 40 µL de solución anticuerpo en PBS por tres horas. Finalmente, las células fueron tratadas con 0, 3X de Medio Completo (concentración final) por 35 minutos. El medio fue removido, y las células fueron lavadas en 80 µL de 1, IX de Amortiguador de Muestra (Invitrogen, Cat. No. NP0007). El Smad1 fosforilado fue determinado mediante Western Blotting utilizando el X Cell Surelock Mini-Cell &

Blot Module (Invitrogen, Cat. # EIO002). Fue detectado el Smad1 utilizando el anticuerpo Smad1 antifósforo de conejo ICell Signaling, Cato No. 95110), que fue detectado luego mediante IRDye™800 Anti-RABBIT IgG (Rockland Immunochemicals, Cat. No. 611-732-127). La cantidad de Smad1 fosforilado fue cuantificada utilizando el Odyssey Infrared Imaginer (Li-Cor). Fue utilizada actina (Santa Cruz, # sc-8432) para la normalización (anti-ratón Alex 680, Molecular Probe, Cat. No. A-21058). Un resumen de valores medios IC_{50} para este ensayo está mostrado en la Tabla 11. Todas las determinaciones de IC_{50} fueron corridas por triplicado.

Tabla 11

Clon	ID1 Taqman IC_{50} nM	pSmad1 Western IC_{50} nM
1.11.1	nd	nd
1.12.1(M29I/D19A)	16	18
1.13.1	100	87
1.27.1	82	70
1.29.1	94	82
1.31.1	24	21
1.162.1	75	15
1.183.1	58	17
4.24.1	100	82
4.38.1	87	52
4.58.1	14	15
4.62.1	24	34
4.68.1	141	110
4.72.1	21	35
5.13.1	30	68

Ejemplo 14. Características de Internalización de los AnticuerDos Anti-ALK-1 Monoclonales

Se utilizan FACS para monitorear el curso de tiempo del receptor de superficie celular ALK-1 restante así como también el anticuerpo de neutralización. La superficie celular ALK-1 es monitoreada mediante un marcador de anticuerpo que es capaz de unirse a la superficie de ALK-1 y aún reconociendo un epítopo diferente del anticuerpo neutralizante. Un ALK-1 anti-Humano de ratón (sistemas R&D, Cat. No. AF310) fue identificado y usado en el estudio como el anticuerpo marcador.

Fue estudiado el curso del tiempo de internalización utilizando líneas de células endoteliales HUVEC y HUAEC. Las células se hicieron crecer a 37°C con 5% de CO_2 en placas de 24 pozos conteniendo 200 µL de un medio de cultivo completo por POZO. En cada uno de 11 puntos de tiempo por sobre el curso de 48 horas, 2 µL de una solución de anticuerpo de 1 mg/mL fueron agregados a un vaso y mezclados (concentración final del anticuerpo neutralizan te es 10 g/mL). La placa fue regresada dentro del incubador a 37°C hasta el punto de tiempo de 0 horas, cuando la placa fue colocada sobre hielo para detener el proceso de internalización. Fue agregado marcador de anticuerpo a los vasos en este punto (10 µg/mL, concentración final) e incubados sobre hielo por 1 hora. LaS células fueron lavadas entonces con PBS despegado mediante tripsinación y transferidos dentro de una placa de 96 pozos. Las células fueron entonces lavadas, bloqueadas, y tratadas con anticuerpos secundarios portadores de fluoroforo diferentes a fin de monitorear tanto el anticuerpo de neutralización como el receptor ALK-1 remanente sobre la superficie de la célula. Las muestras fueron probadas sobre un instrumento de citometría de flujo FACSCalibur, contando

3.000/5.000 eventos/muestra. La Media Geométrica de cada muestra en el canal fluorescente específico fue calculada y trazada como una función de tiempo. Los datos fueron adaptados a una ecuación modificada radio-caída para obtener el tiempo medio ($t_{1/2}$) de internalización así como también el porcentaje de agente de neutralización o receptor ALK-1 restantes en la superficie de la célula cuando la internalización alcanzó el estado estable. Tal como se muestra en la Figura 6, el mAb 1.12.1(M29I/DI9A) internaliza al misma proporción y en el mismo grado como el receptor ALK-1 de superficie de célula. La vida media de la internalización del 1.12.1(M29I/DI9A) es ~2 horas. Se alcanza un equilibrio cuando el 50% del anticuerpo estaba internalizado. Un anticuerpo policlonal comparado de sistemas R&D (Cat. # AF370) internaliza a un $t_{1/2}$ de 1 hora y alcanza el estado estable con ~70% del receptor estando internalizado (Figura 6). Características similares de internalización fueron observadas con otros anti-ALK-1 mAbs humanos de la invención (no mostrado).

Ejemplo 15. Establecimiento del Prepucio humano - Quimeras de Ratones SCID

Se hace una modificación significativa del procedimiento quirúrgico a un procedimiento publicado previamente por H-C Van, et al., "modification of the surgery procedure was made to a procedure published previously by H-C Yan, et al "Human/Severe Combined Immunodeficient Mouse Chimeras, An Experimental In Vivo Model System to Study the Regulation of Human Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecules", J. Clin. Invest 91 :986, 1993; J. Varner "Regulation of Angiogenesis in Vivo by Ligation of Integrin a5b1 with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin" Amer. J. Pafft.156 (4):1345, 2000; K. Tahtis, et al "Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model"

Mol. Cancer. Ther. 2(8):729, 2003.. Después de la llegada del National Disease Research Institute and Cooperative Human Tissue Network, piezas de piel del prepucio fueron recortadas de regiones insanas y transferidas a un medio RPMI (CellgrojMediatech, Cat. # MT-15-040-CV complementadas con Penicilina y Estreptomicina (Gibco/Life Tech. Cat. # 15070-063) (agregar 5 mL de la solución de inventario de penicilina y estreptomicina a 500 mL de RPMI). Usando un escapelo y cortando en un plato petri estéril, las pieles fueron recortadas en una forma oval de aproximadamente 8 x 13 mm, limpiando cualesquiera extremos rasgados y tejidos conectores, y almacenadas sobre hielo húmedo antes de la cirugía. El volumen apropiado de solución (4µL/gramo de animal) de 100 mg/mL de Cetamina (KetasetTR, Port Dodge Animal HeaUh)j 1 mg/mL de metetomidina (Pfizer Animal Health - Dormitor) fue inyectado intra-peritonealmente dentro del abdomen de ratón vid (Es decir, en un ángulo de 45°, debajo de la piel pero no demasiado interno). Una vez anestesiados, a los ratones les fue aplicado lubricante de ojo, una inyección subcutánea de Ketoprofen (10 mg/kg, Fort Dodge Animal HeaUh) y el pelo fue afeitado sobre el lugar de la cirugía. La región quirúrgica fue fregada quirúrgicamente tres veces utilizando el Clorahexiderm (Butler, Chc1o-Scrub 40, cat. # WAB20109) y, luego, el alcohol en un movimiento circular que se inició en el centro del lugar quirúrgico hacia fuera y evitó ir desde un área sucia hacia un área limpia. Los ratones fueron transferidos a la capucha quirúrgica y colocados sobre la almohadilla de agua calentada (Gaymar Industries, Cat. # TP500 T7Pump) que fue mantenida a 37°C. Los ratones fueron colocados luego bajo anestesia isofluorin por la duración de la cirugía. El lado dorsal de un ratón fue cubierto con una cortina quirúrgica cortada para exponer el lugar de la cirugía. La piel de ratón fue elevada con fórceps y un tejido de piel de forma oval fue cortado con tejeras curvadas con un movimiento. Un prepucio humano de tamaño apropiado fue colocado sobre el ratón. La piel humana y del ratón fueron

suturadas en conjunto utilizando la sutura Ethilon (Ethilon, Cat. # 697H.), comenzando en el tope del óvalo, luego el fondo, luego la derecha lejana y luego el lado izquierdo más lejano. Fueron hechas más entre-suturas para asegurar aún más los tejidos en un conjunto. Fueron hechas aproximadamente 8 suturas equidistantemente alrededor de la piel. Durante la cirugía, se usó una jeringa con solución salina estéril para irrigar la herida quirúrgica piel ratón cuando la misma se secaba. Fue colocada una Bandaid (Bandita) sobre la herida. Un vendaje transparente (3M Tegaderm™) fue usado luego para envolver flojamente alrededor del vendaje. El vendaje fue cortado a tamaño para cubrir un área ligeramente más ancha que la Bandaid. Al ratón le fue dado Atipamezola (50-100 JlL, Pfizer Animal HeaUh, Antisedan) y el ratón recuperado en una jaula calentada por 5 - 10 mino El vendaje y la cura fueron removidos en 7 - 10 días y por el 15° día en la mayoría de las pieles aparecieron costras. La cicatrización completa ocurrió entre 21-28 días, después de cuyo tiempo las pieles estaban listas para ser inoculadas con células de tumor. Mostrado en el Ejemplo 8 está un ejemplo del análisis histológico (H & E Staining) de una sección de la piel injertada post-cirugía. La histología de la piel injertada se parece mucho a las características de una piel humana implantada en ratones descrita por Tahtis et. al., "Expresión and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human SkinjSevere Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model" Mal. Cancer Ther. 2(8).729, 2003. h.e.: capa epidérmica humana; h.d.: capa dérmica humana.

Ejemplo 16. Modelo Colágeno en el Prepucio humano - Ratones Ouimera SCID

Una solución madre de Colágeno I (cat. # 354236, Becten-Dickinson) fue diluida en 4 mg/mL con 0, 02 N ácido acético y fue mantenida enhielo antes de la implantación. La solución de colágeno acídica (8 partes) fue mezclada con

203

10XM199 (Sigma, Cat. # M9163) (1 parte) y fibronectina de plasma humano (Fn) (cat. # 354008, Becten-Dickinson) para alcanzar una concentración final de Fn de 90 JILjmL; NaOH)1, 0 N) fue agregado para ajustar el pH a -7, 2. La mezcla de Colágeno/Fn fue mantenida en hielo hasta el uso. La mezcla de implante fue preparada utilizando 1 mezcla anterior Colágeno/Fn más un inhibidor angiogénico de interés con o sin células endoteliales macrovasculares humanas (HMVEC), (Cascade Biologics, Cat. # C-O 1 0-5C). Las HMVECs se preparan como 6 x 106 células/mL en PBS. Fue inyectada intradérmicamente 50 - 100 µL de la mezcla de implante dentro del prepucio de los ratones quiméricos scid. De 7 a 14 días más tarde, los tapones de colágeno fueron cosechados, sumergidos en el compuesto DCT (cat. # 4583, Sajura Finetek, CA) y congelados rápidamente para el análisis inmunohistoquímico. El tapón de colágeno en el prepucio fue identificado con el kit Trichrome Kit (cat. # KC1641, Mater. Tech. CA) como manchado azul tal como se muestra en la Figura 9(A). Los vasos sanguíneos humanos fueron identificados mediante el manchado para P-CAM humano utilizando el anticuerpo CD-31 anti-Humano (Clon 13.3, Vector Laboratories) (Figura 9(B)). La Tabla 12 resume el manchado y cuantificación del vaso sanguíneo humano en el modelo colágeno en el prepucio - ratones quiméricos SCID.

Tabla 12. Resumen de los Resultados del Modelo Colágeno

Matriz	HMVEC para Matriz	Tratamiento (Rx)	Días de Rx	Punto Final de Estudio	Marcación de Vaso Sanguíneo Humano /1 x 103)	%de Control (vasos sanguíneos Humanos)
1,6 mg/ml Colágeno	Ninguno	Sin tratamiento	4		0.036 ± *0.001*	40

1,6 mg/ml Colágeno	7 x 103	Sin tratamiento	4		0.071 ± 0.022	78
1,6 mg/ml Colágeno	7 x 103	Sin tratamiento	4		0.063 ± *0.016*	69
2,4 mg/ml Colágeno	Ninguno	Sin tratamiento	4	Manchado CD-31 Humano	0.091 ± 0.056	100
2,4 mg/ml Colágeno	7 x 103	Sin tratamiento	4		0.067 ± 0.049	74
3,0 mg/ml Colágeno	1,4x104	Sin tratamiento	4		0.062 ± 0.047	68
3,0 mg/ml Colágeno	8,8 x 103	Sin tratamiento	4		54 ± 9	100
3,0 mg/ml Colágeno	8,8 x 103	Anticuerpo de control isotipo 100µg/ml mezclado en gel	4	Manchado CD-31 Humano	53 ± 13	96
3,0 mg/ml Colágeno	8,8 x 103	Anticuerpo 1.12.1(M29I) 100µg/ml mezclado en gel	4		15 ± 3	28
3,0 mg/ml Colágeno	Ninguno	Sin tratamiento	4	Manchado CD-	0,112 ± 0,026	100
3,0 mg/ml Colágeno	Ninguno	Sin tratamiento	4	31 Humano	0,031 *10,012*	28
3,0 mg/ml Colágeno	Ninguno	Anticuerpo de control isotipo 100 µg/ml inyección i.d.	4		75 ± 15	100

3,0 mg/ml Colágeno	Ninguno	Anticuerpo 1.12.1(M29I) 100 µg/ml inyección Ld.	4	Manchado CD-31 Humano	39 ± 11	52
3,0 mg/ml Colágeno	Ninguno	Anticuerpo 1.14.1 100 µg/ml inyección Ld.	4		44 ± 28	59

Ejemplo 17. Modelo de Tumor M24mer en Prepucio humano - Ratones mg/mL quiméricos SCID

Típicamente, fueron utilizadas en estos estudios edades de injertos de 5-10 semanas post-cirugía. La línea celular M24met fue descrita por Mueller y co-trabajadores en "Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells", Cancer Research, 55(8): 1629-32, 1995. Fue preparada una suspensión de célula M24met como sigue: fueron lavadas 80% de células co-fluentes M24met, tiptonizadas utilizando Trpsin/EDTA (Gibco, Cat. # 25200-056) y recolectadas en el medio PRMI (Cellgro/Mediatech, (Cellgro/Mediatech, Cat. # MT-15-040-CV) suplementado con 10% FBS Cat. # AKD-11775) y 2 mM de L-glutamina (Cellgro/Mediatech, Cat. # 25-005-CI). Las células fueron centrifugadas a 600 rpm por 5 minutos, re-suspendidas en PBS estéril. Fueron estimadas la cuentas de células utilizando en contador Coulter Counter (Beckman Coulter, Modelo 22). Las células fueron centrifugadas a 600 rpm por 5 minutos y fueron re- suspendidas en una mezcla de Collagen y Fn (3 mg/ml) para obtener una suspensión de células de 4 x 107 células/ml por implantación.

206

Para inocular, fueron inyectadas intradérmicamente 2 x 106 de las células anteriores (50 µl de 4 x 107 células/ml) dentro de la piel humana injertada en el ratón. En el día 5-7 post-implante, los tumores serían palpables y los ratones serían repartidos aleatoriamente dentro de los grupos de Control y Tratamiento antes de comenzar la dosificación. El grupo Control es definido de manera tal que los animales recibieran ninguna dosis, dosis del Vehículo en el cual fue constituido el anticuerpo anti-ALK-1, o dosis del isotipo acoplado al anticuerpo anti-KLH monoclonal humano IgG2 (Pfizer Inc.). El grupo Tratamiento es definido de manera tal que los animales recibieran una dosis del anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1(M291/D 19A).

Ejemplo 18. Manchado Doble con Inmunofluorescencia (IFI de humano v Ratón CD31

Las secciones de tejido congelado fueron secadas y adaptadas a -20°C en acetona (Fischer, Cat. # A16S-4), en 10 minutos. Las muestras fueron secadas al aire de nuevo y lavadas tres veces en PBS por 5 minutos cada una. Las muestras fueron bloqueadas en suero de conejo al 5% (Vector Laboratories, Cat. # S-5000) en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla primera de anticuerpos fue preparada en suero de conejo al 5% con el anticuerpo anti-humano CD31 (Santa Cruz, Cat. # SC1505) y anti-ratón CD31 (Pharmingen, Clone Mec 1, 3, 3, Cat. # 01951A) en diluciones de 1:1000 y 1:500, respectivamente. La mezcla anticuerpo anterior fue agregada a las muestras de tejido por 1 hora a temperatura ambiente (RT). Los bloques fueron lavados tres veces en PBS por 5 minutos cada uno antes de ser incubados con la mezcla de anticuerpos secundaria por una hora a temperatura ambiente. La mezcla de anticuerpos secundaria fue preparada en PBS/O, O% Tween-20 (Sigma, Cat. # P1379), anticuerpo anti-cabra Texas Red

(Jackson Labs., Cat. #305-075-003) y anticuerpo anti-Rata de conejo FIAC (Jackson Labs., Cat. #312-095-003). Los anticuerpos fueron diluidos a 1 :50 sí fueron usados anticuerpos congelados o al: 100 sí se utilizan anticuerpos frescos. Los portaobjetos fueron mantenidos en la oscuridad y a 4°C hasta el análisis de imagen. El análisis de imagen fue efectuado utilizando un microscopio fluorescente Olimpos BX60 y fueron tomadas fotografías utilizando una cámara digital a color de micra-disparo Olympus. Fueron tomadas fotos de 3-5 puntos calientes/ diapositivas, un diapositiva/animal, 4-7 animales/grupo y las áreas de vasos sanguíneos según como están indicadas por el manchado positivo de anti-humano CD-31 fueron cuantificadas mediante tres individuos que usan Jm&ge Pro Plus v4.5 (MediaCybernetics). El punto final farmacodinámico (grupo medio) fue expresado ya sea como el porcentaje de 'inhibición del .CP31', humano comparada al grupo Control o como el área total de vasos sanguíneos humanos. El significado estadístico fue determinado mediante ANOVA. Mostrada en la Figura 10, está una imagen inmunofluorescente de vasos sanguíneos humanos (rojo) y ratón (verde) del tumor M24met en el ratón quimera SCID de prepucio humano.

Ejemplo 19. Manchado Inmunohistoquímica (IHC) CD-31 humano

Secciones de tejido congelado fueron secadas al aire y ajustadas a -20°C en acetona por 10 minutos. Las muestras fueron incubadas en 0, 075% H202/metanol (Fischer Cat. # A433-4) por 15 minutos y lavadas tres veces en PBS por 5 minutos cada una. Las muestras fueron bloqueadas en suero de conejo al 5%/PBS por 30 minutos y aplicadas con anticuerpo anti-humano CD-31 1:100 (Santa Cruz, Cat. # SC1505) en 5% de suero de conejo por 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas dos veces en PBS por 5 minutos cada una

208

y aplicadas con conejo anti-cabra al 5% (Vector Labs., Cat. # BA-500) en suero de conejo al 5% por 35 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados dos veces en PBS por 5 minutos cada uno y fue agregada estreptavidina de elaboración fresca (Vector Labs., kit ABC Elite Kit, Cat. # PK-6100). Los portaobjetos fueron lavados dos veces en PBS por 5 minutos cada uno y luego desarrollados en diaminobencina (DAB) (Vector Labs., Cat. # SK-4100). Los portaobjetos fueron lavados dos veces en PBS por 5 minutos cada uno seguido por haematoxilin de Mayers (Sigma, Cat. # HHS-32) por 5 segundos. Las muestras fueron enjaguadas buen en diH20 y sumergidas brevemente por dos veces en solución de hidróxido de amoníaco diluida (5 ml inventario en 1 L de diH20) (Sigma, Cat. # A-6899) y enjaguadas de nuevo en diH_2O. Las muestras fueron entonces deshidratadas en el alcohol al 70%, luego en el de 90%, y luego en el de 100% (Harleco, Cat. # 65347/85) por 1 minuto cada una y, finalmente, en xileno (JT Baker, Cat. # 516.09). Los portaobjetos fueron montados con Cytoseal 60 (Stephens Scientific, Cat. # 8310-4), cubiertos co cubre-portadores para el análisis de imagen. Mostrado en la Figura 11, está una imagen IHC de vasos sanguíneos humanos (marrón) del tumor M24met en el ratón quimera SCID de prepucio humano.

Ejemplo 20: Tratamiento Terapéutico con el anticuerpo Anti-ALK-1 1.12.1 (M29I/D19A)

Para el tratamiento, la dosificación se desarrolla ya sea subcutáneamente (sc) o intravenosamente (iv). Típicamente, fue dada una dosis del anticuerpo 1.12.1(M29I/D19A) para cada estudio. La segunda dosis del anticuerpo ALK-1, sí era necesaria, fue administrada en el día 9 o 10. Algunas veces, niveles de dosis múltiples, es decir, 1, 5, 10, 50 mg/kg., fueron administrados para investigar la

209

inhibición dependiente de la dosis del desarrollo del vaso sanguíneo humano. Los animales fueron monitoreados diariamente y los tumores fueron medidos tres veces por semana mediante calibradores. Para el día 14 -17 los tumores eran entre 250-350 mm3 y fueron removidos de los ratones, sumergidos en OCT y congelados para el análisis IF o IHC. Mostradas en la Figura 12, están imágenes inmunofluorescentes representativas de los vasos sanguíneos humanos (rojo) y de ratón (verde) del Control y los tumores M24met Tratados 1.12.1(M29I/D19A) (10 mg/kg) en el prepucio humano del ratón quimera scid. La inhibición dependiente dosis de los vasos sanguíneos humanos por 1.12.1 (M29I/D 19A) en el prepucio humano del ratón quimera está mostrada en la Figura 13 y está presentado un resumen de estudios relacionados en la Tabla 13.

Tabla 13

Resumen de la caracterización del modelo *in vivo* y la inhibición del desarrollo de los vasos sanguíneos humanos de los tumores M24met en el modelo quimera SCID

210

Parámetros de Protocolo					Puntos Finales		Notas Generales
Tumor	Droga	Dosis	Ruta	Programa	CD31 (% Inhibición Comparado a Control)	Dias de Estudio	
MCF-7	ninguno	na	na	na	No cuantificada	19	Tumores implantados intradérmicamente. Probados con y sin implantes de estradiol y colágeno. Tumores crecieron lentamente y expresaron poco CD31.
M24met	ninguno	na	na	na	No cuantificada	19	Tumores implantados intradérmicamente. Probados con y sin matriz de colágeno/ FN. Con matriz se encontró desarrollo superior del tumor, todos los estudios futuros contendrán matriz suplementaria. Los Tumores mostraron un buen manchado humano CD31.
M24met (pequeño)	ninguno	na	na	na	No cuantificada	9	Tamaño del tumor < 100-200 mm. Poco CD31 humano.
M24met (medio)	ninguno	na	na	na	No cuantificada	12	Tamaño del tumor < 100-200 mm. Algún CD31 humano.
M24met (gmde)	ninguno	na	na	na	No cuantificada	12	Tamaño del tumor < 200 mm. Los grandes tumores M24met tienen números superiores de manchado de vasos sanguíneos humanos. Futros estudios serán conducidos con tumores más grandes.

Parámetros de Protocolo					Puntos Finales		Notas Generales
Tumor	Droga	Dosis	Ruta	Programa	CD31 (% Inhibición Comparado a Control)	Dias de Estudio	
M24met	IgG No -Específico humano	10 mg/kg	IV	2 dosis	0		Primer estudio de filtrado. 1.12.1(M29/D19A)

211

	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	IV	(dóas 5 & 9)	42	15	mostró reducción significativa de manchado CD31 humano. No se observó inhibición de desarrollo de tumor.
M24met	IpG No -Específico humano	10 mg/kg	IV	2 dosis (dóas 5 & 10)	0	14	Segundo estudio de filtrado. Resultados confirmados de GW-366 No se observó inhibición de desarrollo de tumor.
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	IV		40		
M24met	No -Específico humano	10 mg/kg	SC	2 dosis (dóas 5 & 10)	0	14	Primera prueba de actividad dependiente de dosis de 1.12.1(M29I/D19A) contra CD31 humano. Se observó algún efectro dependientemente de dosis. Resultados PK indican que una dosis simple no será suficiente para una reducción significativa en CD31. No se observó inhibición de desarrollo de tumor.
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	SC		43		
M24met	1.12.1(M29I/D19A)	1 mg/kg	SC	2 dosis (día 5)	50		
	1.12.1(M29I/D19A)	1 mg/kg	SC		20		
M24met	Ninguna dosis	0 mg/kg	na	na	ND	16	Segunda prueba de actividad dependiente de dosis de 1.12.1(M29I/D19A) contra CD31 humano. Claro efecto dependientemente de anti-CD31. No se observó inhibición de desarrollo de tumor.
	Isotipo acoplo IgG	10 mg/kg	SC	2 dosis (día 5)	0		
	IpG No -Específico humano	10 mg/kg	SC		ND		
	1.12.1(M29I/D19A)	1 mg/kg	SC		24		
	1.12.1(M29I/D19A)	5 mg/kg	SC		59		
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	SC		72		

Parámetros de Protocolo					Puntos Finales		
Tumor	**Droga**	**Dosis**	**Ruta**	**Programa**	**CD31 (% Inhibición Comparado a Control)**	**Dias de Estudio**	**Notas Generales**
M24met	Isotipo acoplo IgG	10 mg/kg	SC	2 dosis (día 5)	0	14	Primera prueba de amplio rango de dosis para 1.12.1(M29I/D19A). El estudio mostró buenos efectos dependientes de
	1.12.1(M29I/D19A)	1 mg/kg	SC		33		
	1.12.1(M29I/D19A)	3 mg/kg	SC		41		
	1.12.1(M29I/D19A)	5 mg/kg	SC		60		
	1.12.1(M29I/D19A)	7,5 mg/kg	SC		60		
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	SC		73		

5

	1.12.1(M29I/D19A)	50 mg/kg	SC		70		dosis. Los datos de ajuste a una respuesta de dosis sigmoidal produce un IC50 de 93 nM. No se observó inhibición de desarrollo de tumor.

Ejemplo 21. Determinación del EC_{50} in vivo

Ratones quimera SCID con prepucio humano fueron implantados intradérmicamente con células M24met y fueron tratados (sc) con anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1(M29I/D19A) a 1, 3, 5, 7, 5 10 y 50 mg/kg o con un anticuerpo anti-humano KLH de acople de isótopo (10 mg/kg). Después de la conclusión del experimento, el área de vasos sanguíneos de cada tumor fue cuantificada como se describió anteriormente. Las concentraciones de plasma de ratón del anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1(M29I/D19A) fueron medidas utilizando el método descrito como sigue: muestras de suero de ratones fueron analizadas por concentración del anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1(M29I/D19A) mediante un ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Unido por Enzima). Las placas del ELISA fueron revestidas con 10 ug/ml de anticuerpo específico IgG Fc antihumano de cabra (Pierce, Cat. # 31123) en PBS, incubado durante toda la noche a 4°C, y bloqueado luego con amortiguador de bloqueo StartBlock (Pierce, Cat. # 37542) a temperatura ambiente por 1 hora. Las muestras de suero fueron diluidas antes del análisis en 100 y 100 veces en amortiguador de bloqueo StartBlock. Fueron preparados dos juegos en el molde de suero diluido 100 y 1000 veces. Las muestras normales y diluidas de suero fueron incubadas en la placa por 1 hora. Fue detectado anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1(M29I/D19A) unido utilizando peroxidasa de rábano (HRP) como el marcador del anticuerpo IgG (Fb específico)

antihumano de cabra (Sigma, Cat. # T8665). La absorbencia fue leída en 450 nm en un lector de placa Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Una curva estándar fue adaptada utilizando regresión no lineal. El límite de detección de este ensayo era 10 ng/ml de anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I/D19A).

La concentración del plasma de ratón SCID del anticuerpo anti-ALK-1 1.12.1(M29I/D19A) está mostrada en la Figura 15.

La Figura 15 representa el EC_{50} estimado para 1.12.1 (M29I/D19A) en el Modelo de quimera SCID de Prepucio M24met. El área de vasos sanguíneos humanos fue trazada contra el PK promedio del plasma a través del período de estudio (14 días) para cada grupo de tratamiento. Una curva adaptada fue producida por medio del programa Dependiente de Dosis Sigmoide en la almohadilla de gráficos (Prizm). Un EC_{50} de 93 ng/ml se deriva de la curva adaptada (EC_{50} está definida como la concentración de plasma requerida para una reducción del 50% del área de vasos sanguíneos humanos en el grupo de Control).

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patentes citadas en esta especificación están incorporadas aquí como referencia tal como si la publicación individual o solicitud de patente fueron específica e individualmente indicadas para ser incorporadas como referencia. Aunque la invención anterior ha sido descrita en algún detalle a manera de ilustración y ejemplo para los propósitos de claridad de comprensión, será rápidamente aparente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que ciertos cambios y modificaciones pueden ser hechos en la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones anexas.

214

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno de este, que se une a ALK-1, que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y una cadena liviana que comprende SEQ ID NO: 8.

2. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de aminoácido de la cadena liviana de SEQ ID NO: 4.

3. Un El anticuerpo o la porción de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena liviana de SEQ ID NO: 8.

4. Un anticuerpo monoclonal, o una porción de unión a antígeno de este, que se une a ALK-1, el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de SEQ ID NO: 100 y que comprende una secuencia de aminoácido de la cadena liviana de SEQ ID NO: 102.

5. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o 3, el anticuerpo monoclonal es una molécula IgG 1 o IgG2.

6. Un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión a antígeno de este, que se une ALK-1 y tiene por lo menos una propiedad adicional seleccionado del grupo que consiste de:

215

a) se une al dominio extracelular de ALK-1 primate con un valor de avidez de 5 nM o menos como se mide por resonancia de plasmón de superficie;

b) se une al dominio extracelular ALK-1 de humano con un valor de avidez de 250 pM o menos tal como se mide por resonancia de plasmón de superficie;

c) tiene una constante de disociación (K_{dis}) para ALK-1 humano de 5 $x10^{-3}$ s^{-1} o más pequeño como se mide por resonancia de plasmón de superficie;

d) se une al ALK-1 de primate con un K_D de 50 nM o menos, tal como se mide por citometría de flujo;

e) tiene una K_D(roedor)/K_D(primate) que es mayor de 1.5;

f) tiene un IC_{50} de 150 nM o menos como se mide por la inhibición de la sobre-regulación de un gen objetivo específico con dirección a 3' de ALK-1, Id1;

g) tiene un IC_{50} de 150 nM o menos tal como se mide por la inhibición de la fosforilización Smad1 determinada mediante Western Blotting;

h) inhibe la angiogénesis de los vasos sanguíneos humanos en un ratón SCID injertado con tejido de prepucio humano, en el cual han sido implantadas intradérmicamente células de tumor M24met de melanoma humana como se determina por medio del análisis IHC del ensayo de señal de CD-31 humano por al menos 40% según se compara con una muestra de control;

i) inhibe la angiogénesis de los vasos humanos en un ratón SCID injertado con tejido de prepucio humano, en el que el colágeno se implanta intradérmicamente como se determina por medio del análisis IHC del ensayo de señal CD-31 humano por al menos 50% cuando se compara con una muestra de control;

j) compite por la unión a ALK-1 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1(rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1;

k) compite de forma cruzada por la unión a ALK-1 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1;

l) se une al mismo epítopo de ALK-1 a ALK-1 como un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1;

m) se une al ALK-1 con sustancialmente la misma K_D como un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A);

217

1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1(rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1;

n) se une a ALK-1 con sustancialmente la misma K_{dis} como un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de 1.11.1; 1:12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1(rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; y 5.59.1.

7. El anticuerpo o porción de unión a antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende del dominio V_H que es por lo menos 90% idéntico en secuencia de aminoácido de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; y 104.

8. El anticuerpo o porción de unión a antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende del dominio V_L que es por lo menos 90% idéntico en secuencia de aminoácido a alguna de las SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80; 84; 88; 92 y 127.

9. Un anticuerpo monoclonal, o una porción de unión a antígeno de este, que se une a ALK-1, en donde dicho anticuerpo comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios variables de cadena pesada y liviana, respectivamente de
SEQ ID NOs: 6 y 8;

SEQ ID NOs: 10 y 12;

SEQ ID NOs: 14 y 16;

SEQ ID NOs: 18 y 20;

SEQ ID NOs: 22 y 24;

SEQ ID NOs: 26 y 28;

SEQ ID NOs: 30 y 32;

SEQ ID NOs: 34 y 36;

SEQ ID NOs: 38 y 40;

SEQ ID NOs: 42 y 44;

SEQ ID NOs: 46 y 48;

SEQ ID NOs: 50 y 52;

SEQ ID NOs: 54 y 56;

SEQ ID NOs: 58 y 60;

SEQ ID NOs: 62 y 64;

SEQ ID NOs: 66 y 68;

SEQ ID NOs: 70 y 72;

SEQ ID NOs: 74 y 76;

SEQ ID NOs: 78 y 80;

SEQ ID NOs: 82 y 84;

SEQ ID NOs: 86 y 88

SEQ ID NOs: 90 y 92; o

SEQ ID NOs: 104 y 127.

10. El anticuerpo o porción de unión a antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 9, en donde los dominios V_H y V_L del anticuerpo comprenden las siguientes secuencias, respectivamente:

SEQ ID NOs: 6 y 8;

SEQ ID NOs: 10 y 12;

SEQ ID NOs: 14 y 16;

SEQ ID NOs: 18 y 20;

SEQ ID NOs: 22 y 24;

SEQ ID NOs: 26 y 28;

SEQ ID NOs: 30 y 32;

SEQ ID NOs: 34 y 36;

SEQ ID NOs: 38 y 40;

SEQ ID NOs: 42 y 44;

SEQ ID NOs: 46 y 48;

SEQ ID NOs: 50 y 52;

SEQ ID NOs: 54 y 56;

SEQ ID NOs: 58 y 60;

SEQ ID NOs: 62 y 64;

SEQ ID NOs: 66 y 68;

SEQ ID NOs: 70 y 72;

SEQ ID NOs: 74 y 76;

SEQ ID NOs: 78 y 80;

SEQ ID NOs: 82 y 84;

SEQ ID NOs: 86 y 88

SEQ ID NOs: 90 y 92; o

SEQ ID NOs: 104 y 127; o

la secuencia de aminoácido V_H codificada por la secuencia de nucleótido del inserto encontrado en el clon de *E. coli* depositado bajo el número de acceso ATCC PTA-6864 y la secuencia de aminoácido V_L codificada por la secuencia de nucleótido del inserto encontrado en el clon de *E. coli* depositado bajo el número de acceso ATCC PTA-6865.

220

11. El anticuerpo o porción de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el anticuerpo comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios variables de cadena pesada y liviana, respectivamente de SEQ ID NOs: 6 y 8.

12. El anticuerpo o porción de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 10 o 11 se selecciona del grupo que consiste de:

a) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 6, o difiere de la SEQ ID NO: 6 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 8, o difiere de la SEQ ID NO: 8 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

b) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 10, o difiere de la SEQ ID NO: 10 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 12, o difiere de la SEQ ID NO: 12 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en

donde dicha secuencia con por lo menos sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

c) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 14, o difiere de la SEQ ID NO: 14 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 16, o difiere de la SEQ ID NO: 16 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

d) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 18, o difiere de la SEQ ID NO: 18 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 20, o difiere de la SEQ ID NO: 20 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

222

e) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 22, o difiere de la SEQ ID NO: 22 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 24, o difiere de la SEQ ID NO: 24 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

f) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 26, o difiere de la SEQ ID NO: 26 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 28, o difiere de la SEQ ID NO: 28 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

g) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 30, o difiere de la SEQ ID NO: 30 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y

223

un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 32, o difiere de la SEQ ID NO: 32 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

h) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 34, o difiere de la SEQ ID NO: 34 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 36, o difiere de la SEQ ID NO: 36 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

i) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 38, o difiere de la SEQ ID NO: 38 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 40, o difiere de la SEQ ID NO: 40 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

224

j) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 42, o difiere de la SEQ ID NO: 42 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 44, o difiere de la SEQ ID NO: 44 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

k) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 46, o difiere de la SEQ ID NO: 46 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 48, o difiere de la SEQ ID NO: 48 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

l) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 50, o difiere de la SEQ ID NO: 50 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos

825

240

241

90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 52, o difiere de la SEQ ID NO: 52 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

m) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 54, o difiere de la SEQ ID NO: 54 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 56, o difiere de la SEQ ID NO: 56 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

n) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 58, o difiere de la SEQ ID NO: 58 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 60, o difiere de la SEQ ID NO: 60 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido

conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

o) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 62, o difiere de la SEQ ID NO: 62 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 64, o difiere de la SEQ ID NO: 64 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

p) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 66, o difiere de la SEQ ID NO: 66 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 68, o difiere de la SEQ ID NO: 68 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

q) un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 70, o difiere de la SEQ ID

NO: 70 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 72, o difiere de la SEQ ID NO: 72 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

r) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 74, o difiere de la SEQ ID NO: 74 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 76, o difiere de la SEQ ID NO: 76 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

s) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 78, o difiere de la SEQ ID NO: 78 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 80, o difiere de la SEQ ID NO: 80 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en

donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

t) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 82, o difiere de la SEQ ID NO: 82 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 84, o difiere de la SEQ ID NO: 84 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

u) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 86, o difiere de la SEQ ID NO: 86 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 88, o difiere de la SEQ ID NO: 88 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

v) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 90, o difiere de la SEQ ID NO: 90 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 92, o difiere de la SEQ ID NO: 92 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

w) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 104, o difiere de la SEQ ID NO: 104 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 127, o difiere de la SEQ ID NO: 127 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida;

x) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 6, o difiere de la SEQ ID NO: 6 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y

un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 127, o difiere de la SEQ ID NO: 127 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida; y

y) un anticuerpo o porción de este que comprende un dominio V_H como se establece en la SEQ ID NO: 104, o difiere de la SEQ ID NO: 104 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida, y un dominio V_L como se establece en la SEQ ID NO: 8, o difiere de la SEQ ID NO: 8 por al menos una sustitución de aminoácido conservadora, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida.

13. El anticuerpo o porción de unión a antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno comprende una cadena pesada que utiliza un gen humano V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, VH 4-61 o V_H 4-59, o en donde por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora ocurre en el gen humano V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 o V_H 4-59 en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida.

14. El anticuerpo o porción de unión a antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno comprende una cadena liviana que utiliza un gen humano V_K A27, V_K A2, V_K A1, V_K A3, V_K B3, V_K B2, V_K L1 o V_K L2, o en donde por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora ocurre en el gen humano V_K A27, V_K A2, V_K A1, V_K A3, V_K B3, V_K B2, V_K L1 o V_K L2, en donde dicha secuencia con por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora es por lo menos 90% idéntica en la secuencia de aminoácido a la secuencia no sustituida.

15. El anticuerpo de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 6-14 que es una molécula IgG, una IgM, una IgE, una IgA, o una IgD, o se deriva de las mismas.

16. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende de la secuencia de nucleótido de las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 95, 101, 103, 126, 128 o 129.

17. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótido de las SEQ ID NOs: 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89 o 91.

18. Un hibridoma depositado bajo el número de acceso ATCC de PTA-6808.

19. El anticuerpo producido por el hibridoma de la reivindicación 18, o una porción de unión a antígeno de este.

232

20. Un monoclonal, anticuerpo o una porción de unión a antígeno de este que se une al ALK-1, el anticuerpo o porción que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

a) SEQ ID NO: 2;

b) SEQ ID NO: 4;

c) SEQ ID NO: 6;

d) SEQ ID NO: 8;

e) SEQ ID NO: 100;

f) SEQ ID NO: 102;

g) SEQ ID NO: 104;

h) SEQ ID NO: 127;

i) la secuencia de aminoácido V_H codificada por la secuencia de nucleótido del inserto encontrado en el clon depositado bajo el número de acceso ATCC PTA-6864; y

j) la secuencia de aminoácido V_L codificada por la secuencia de nucleótido del inserto encontrado en el clon depositado bajo el número de acceso ATCC PTA-6865.

21. El anticuerpo o porción de unión a antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada y una secuencia de aminoácido de cadena liviana seleccionada del grupo que consiste de:

a) la secuencia de aminoácido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácido de cadena liviana la SEQ ID NO: 102; y

233

b) la secuencia de aminoácido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 100 y la secuencia de aminoácido de cadena liviana la SEQ ID NO: 42.

22. Un anticuerpo monoclonal humano o una porción de unión a antígeno de este que se unen específicamente al ALK-1 en donde dicho anticuerpo o porción comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido CDR1 seleccionada del grupo que consiste de:

(a) una secuencia de aminoácido CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 136 en donde el G en la posición uno se reemplaza con una D y la S en la posición 5 se reemplaza con una N; y

(b) una secuencia de aminoácido CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 136 en donde el G en la posición uno se reemplaza con una E y la S en la posición 5 se reemplaza con una N.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con los anticuerpos que incluyen anticuerpos humanos y a las porciones de unión a antígeno de estos que se unen al dominio extracelular (ECD) del receptor activita similar a cinasa-1 (ALK-1) y la función que abroga la senda de señalización ALK-1/TGF -beta-1/Smad1. La invención también se relaciona con las inmunoglobulinas de cadenas pesada y liviana derivadas de los anticuerpos anti-ALK-1 humanos y a las moléculas de ácido nucleico que codifican tales inmunoglobulinas. La presente invención también se relaciona con métodos para hacer los anticuerpos anti-ALK-1 humanos, composiciones que comprenden estos anticuerpos y los métodos para el uso de los anticuerpos y las composiciones. La invención también se relaciona con los animales y plantas transgénicos que comprenden moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

FIG. 1

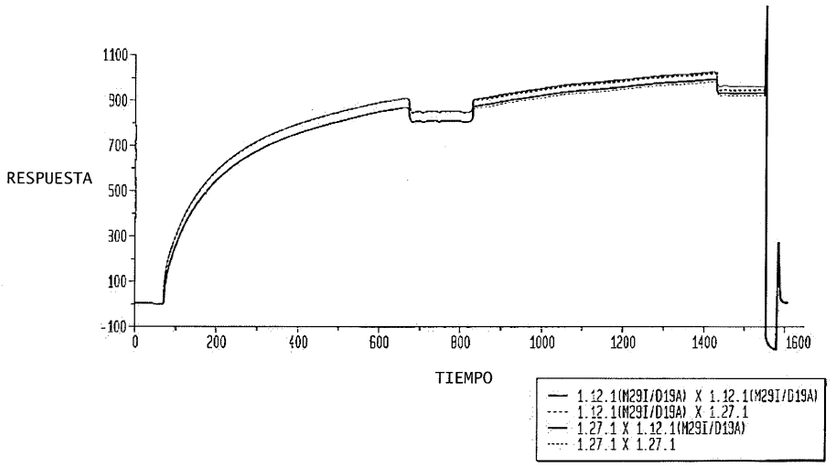

RESPUESTA
1100
900
700
500
300
100
-100
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
TIEMPO
1.12.1(M29I/D19A) X 1.12.1(M29I/D19A)
1.12.1(M29I/D19A) X 1.27.1
1.27.1 X 1.12.1(M29I/D13A)
1.27.1 X 1.27.1

FIG. 2

```
Cyno     MTLGSPRKGLLMLLMALVTQGDPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEG 60
humano   MTLGSPRRGLLMLLMALVTQGDPVKPSRGPLVTCTCESPHCRGPTCQGAWCTVVLVREEG 60
         *******:**********************************:****:************

Cyno     RHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVSLVLEATQPPSEQPGTDGQLA 120
humano   RHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNRNVSLVLEATQTPSEQPGTDSQLA 120
         ************************************:**********.*********.***

Cyno     LILGPVLALLALVALGVLGLWHVRRRQEKQRGLHSELGESSLILKASEQGDTMLGDLLDS 180
humano   LILGPVLALLALVALGVVGLWHVRRRQEKQRGLHSELGESSLILKASEQGDSMLGDLLDS 180
         ****************:************************************:********

Cyno     DCTTGSGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF 240
humano   DCTTGSGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF 240
         ************************************************************

Cyno     RETEIYNTVLLRHDNILGFIASDMTSRNSSTQLWLITHYHEHGSLYDFLQRQTLEPHLAL 300
humano   RETEIYNTVLLRHDNILGFIASDMTSRNSSTQLWLITHYHEHGSLYDFLQRQTLEPHLAL 300
         ************************************************************

Cyno     RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLQCCIADLGLAVMHSQGSD 360
humano   RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLQCCIADLGLAVMHSQGSD 360
         ************************************************************

Cyno     YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTDCFESYKWTDIWAFGLVLWEIARRTIVNGIVED 420
humano   YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTDCFESYKWTDIWAFGLVLWEIARRTIVNGIVED 420
         ************************************************************

Cyno     YRPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCVDQQTPTIPNRLAADPVLSGLAQMMRECWYPNPSARL 480
humano   YRPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCVDQQTPTIPNRLAADPVLSGLAQMMRECWYPNPSARL 480
         ************************************************************

Cyno     TALRIKKTLQKISNSPEKPKVIQ 503  (SEQ. ID NO.:130)
humano   TALRIKKTLQKISNSPEKPKVIQ 503  (SEQ. ID NO.:93)
         ***********************
```

FIG. 3A

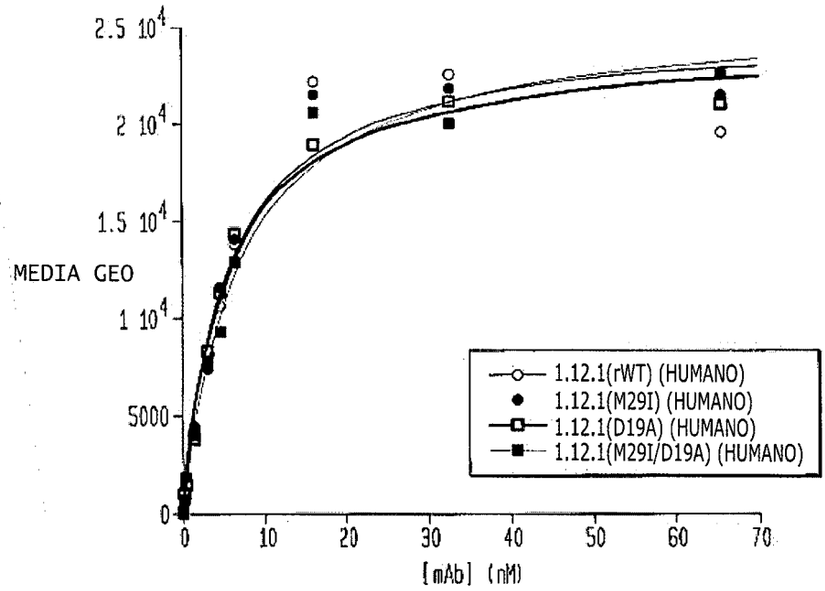

2.5 10^4
2 10^4
1.5 10^4
1 10^4
5000
0
MEDIA GEO
0
10
20
30
40
50
60
70
[mAb] (nM)
1.12.1(rWT) (HUMANO)
1.12.1(M29I) (HUMANO)
1.12.1(D19A) (HUMANO)
1.12.1(M29I/D19A) (HUMANO)

FIG. 3B

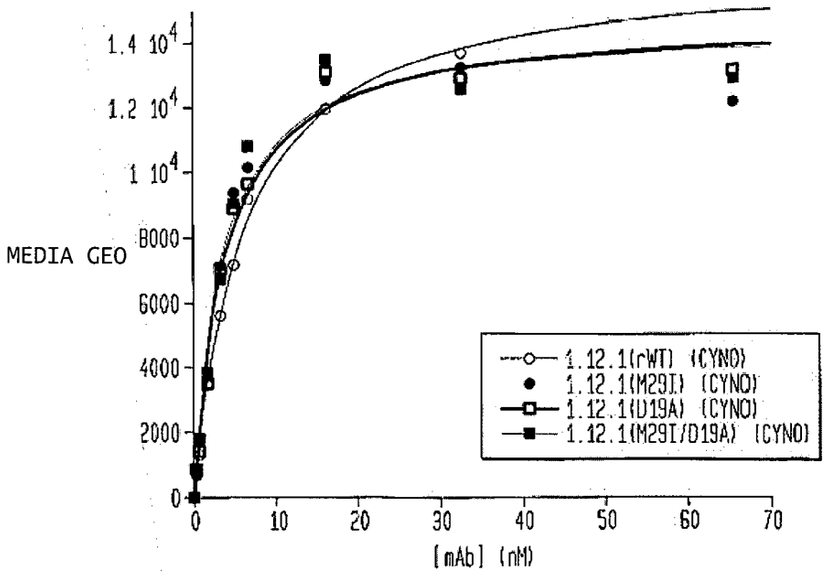
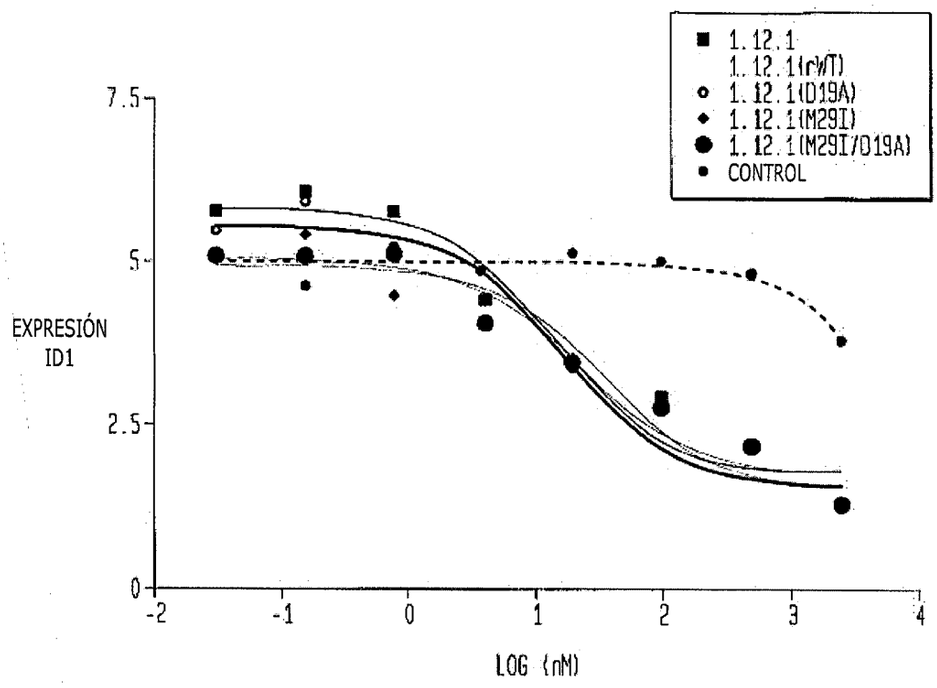
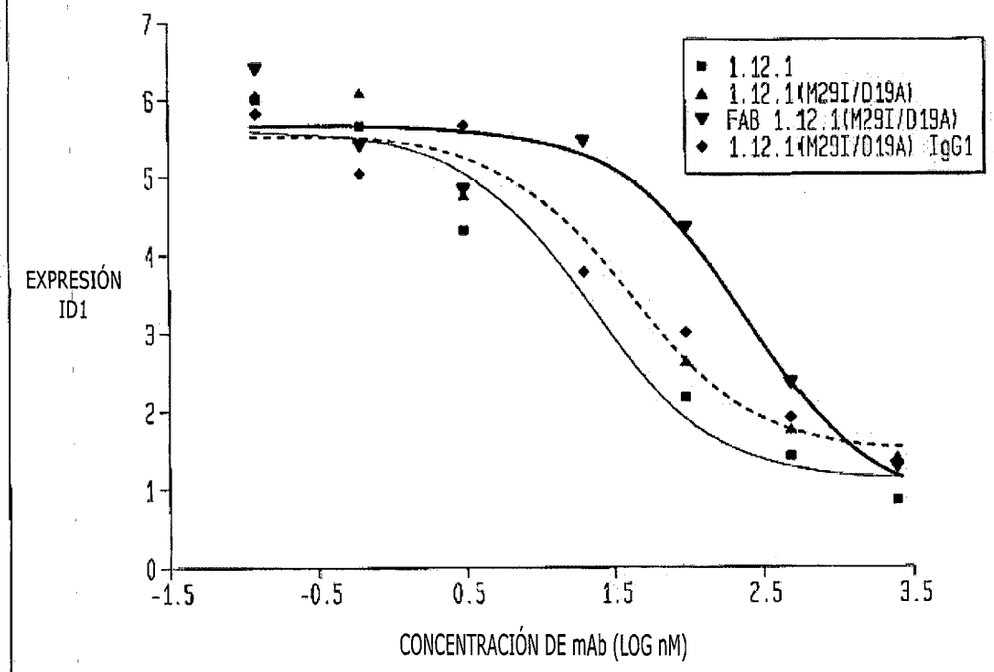

1.4 10^4
1.2 10^4
1 10^4
8000
6000
4000
2000
0
MEDIA GEO
0
10
20
30
40
50
60
70
[mAb] (nM)
1.12.1(rWT) (CYNO)
1.12.1(M29I) (CYNO)
1.12.1(D19A) (CYNO)
1.12.1(M29I/D19A) (CYNO)

FIG. 4



RESPUESTA DE DOSIS SIGMOIDAL	1.12.1	1.12.1(rWT)	1.12.1(D19A)	1.12.1(M29I)	1.12.1(M29I/D19A)	CONTROL
IC50, nM	13.89	8.2	17.06	34.66	22.15	1.10E+09
ERROR IC50	1.61	1.91	1.35	1.62	1.67	NA
R^2	0.9559	0.922	0.9821	0.9544	0.9485	0.8488

FIG. 5



RESPUESTA DE DOSIS SIGMOIDAL	1.12.1	1.12.1(M29I/D19A)	FAB 1.12.1(M29I/D19A)	1.12.1(M29I/D19A) IgG1
IC50, nM	22.81	17.62	254.00	40.95
ERROR IC50	1.62	1.49	1.83	1.65
R^2	0.96	0.97	0.94	0.96

FIG. 6A

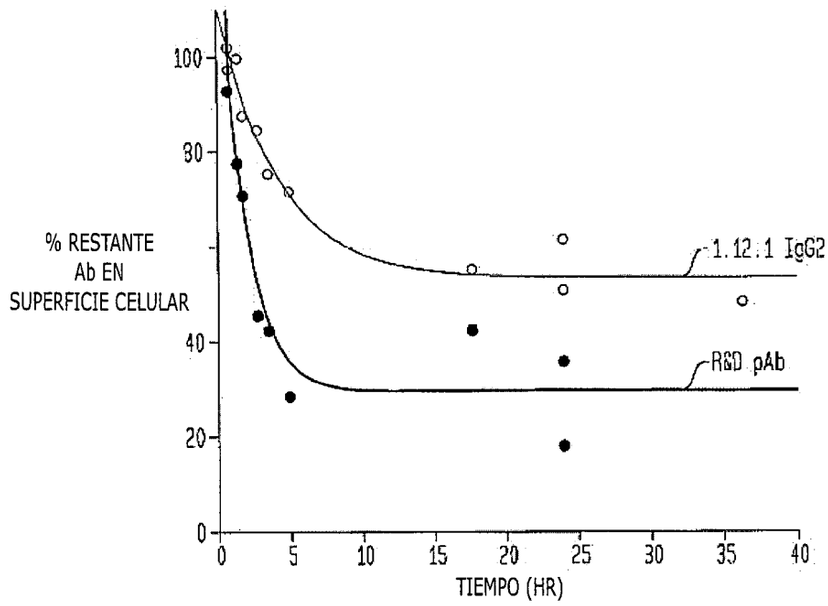

% RESTANTE
Ab EN
SUPERFICIE CELULAR
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
TIEMPO (HR)
1.12.1 IgG2
R&D pAb

FIG. 6B

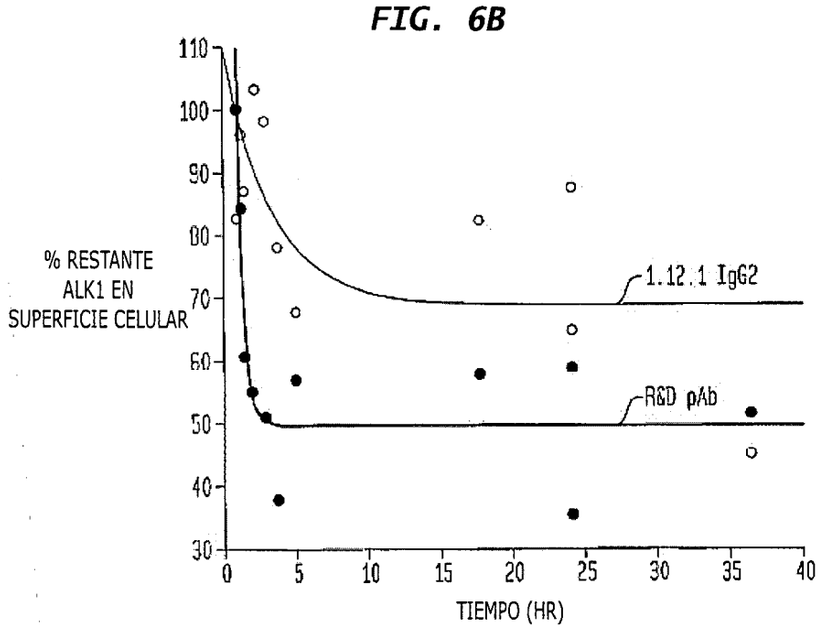

% RESTANTE
ALK1 EN
SUPERFICIE CELULAR
110
100
90
80
70
60
50
40
30
0
5
10
15
20
25
30
35
40
TIEMPO (HR)
1.12.1 IgG2
R&D pAb

FIG. 7A

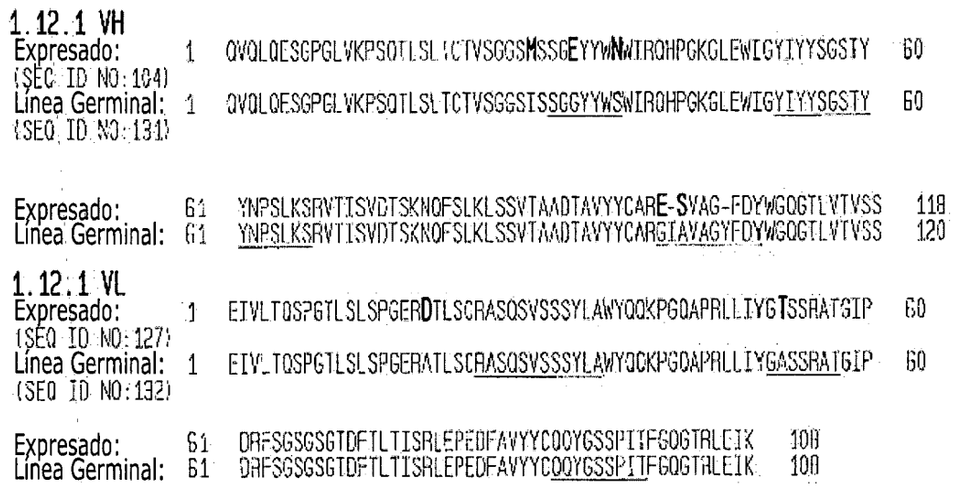

1.12.1 VH
Expresado: 1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSMSSGEYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 60
(SEQ ID NO:104)
Linea Germinal: 1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 60
(SEQ ID NO:131)
Expresado: 61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE-SVAG-FDYWGQGTLVTVSS 118
Linea Germinal: 61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAGYFDYWGQGTLVTVSS 120
1.12.1 VL
Expresado: 1 EIVLTQSPGTLSLSPGERDTLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSSRATGIP 60
(SEQ ID NO:127)
Linea Germinal: 1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 60
(SEQ ID NO:132)
Expresado: 61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTRLEIK 108
Linea Germinal: 61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTRLEIK 108

FIG. 7B

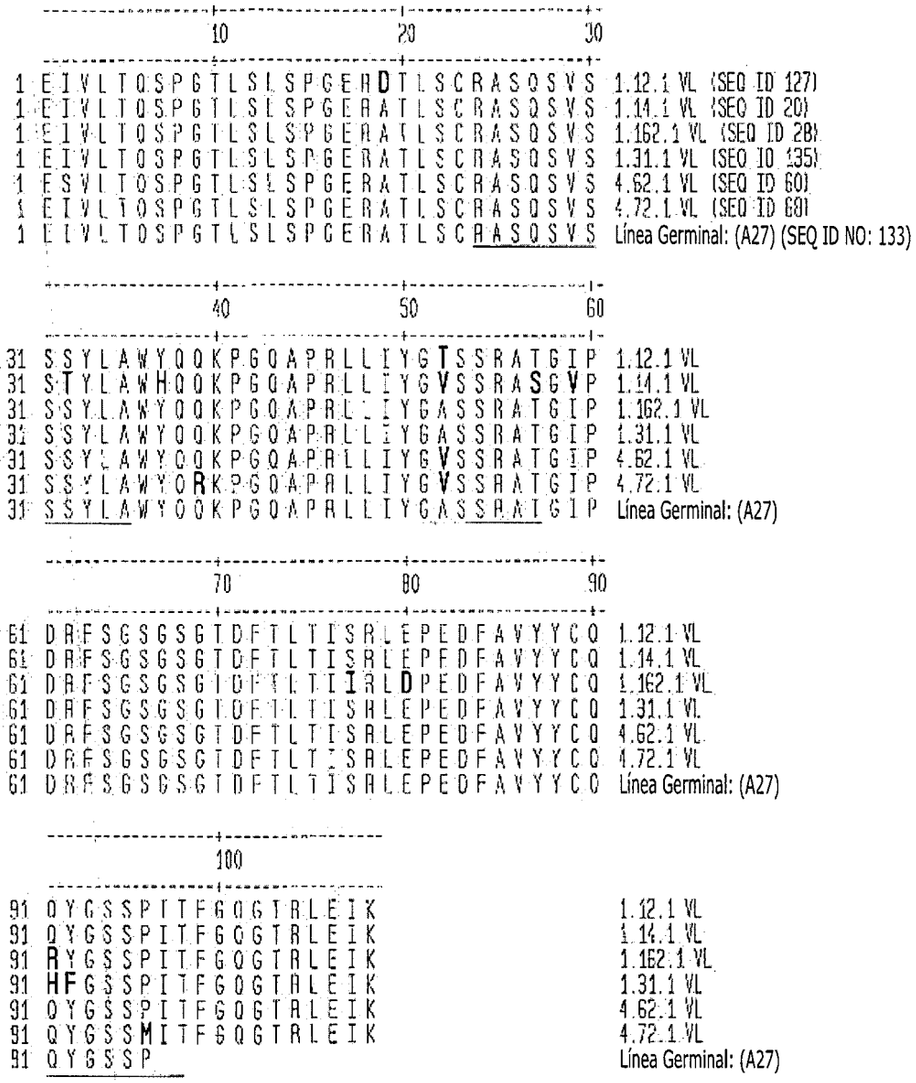

10 20 30
1 EIVLTQSPGTLSLSPGERDTLSCRASQSVS 1.12.1 VL (SEQ ID 127)
1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVS 1.14.1 VL (SEQ ID 20)
1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVS 1.162.1 VL (SEQ ID 28)
1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVS 1.31.1 VL (SEQ ID 135)
1 ESVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVS 4.62.1 VL (SEQ ID 60)
1 ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVS 4.72.1 VL (SEQ ID 68)
1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVS Línea Germinal: (A27) (SEQ ID NO: 133)
40 50 60
31 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSSRATGIP 1.12.1 VL
31 STYLAWHQQKPGQAPRLLIYGVSSRASGVP 1.14.1 VL
31 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 1.162.1 VL
31 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 1.31.1 VL
31 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGVSSRATGIP 4.62.1 VL
31 SSYLAWYQRKPGQAPRLLIYGVSSRATGIP 4.72.1 VL
31 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP Línea Germinal: (A27)
70 80 90
61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ 1.12.1 VL
61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ 1.14.1 VL
61 DRFSGSGSGIDFTLTIIRLDPEDFAVYYCQ 1.162.1 VL
61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ 1.31.1 VL
61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ 4.62.1 VL
61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ 4.72.1 VL
61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ Línea Germinal: (A27)
100
91 QYGSSPITFGQGTRLEIK 1.12.1 VL
91 QYGSSPITFGQGTRLEIK 1.14.1 VL
91 RYGSSPITFGQGTRLEIK 1.162.1 VL
91 HFGSSPITFGQGTRLEIK 1.31.1 VL
91 QYGSSPITFGQGTRLEIK 4.62.1 VL
91 QYGSSMITFGQGTRLEIK 4.72.1 VL
91 QYGSSP Línea Germinal: (A27)

FIG. 7C

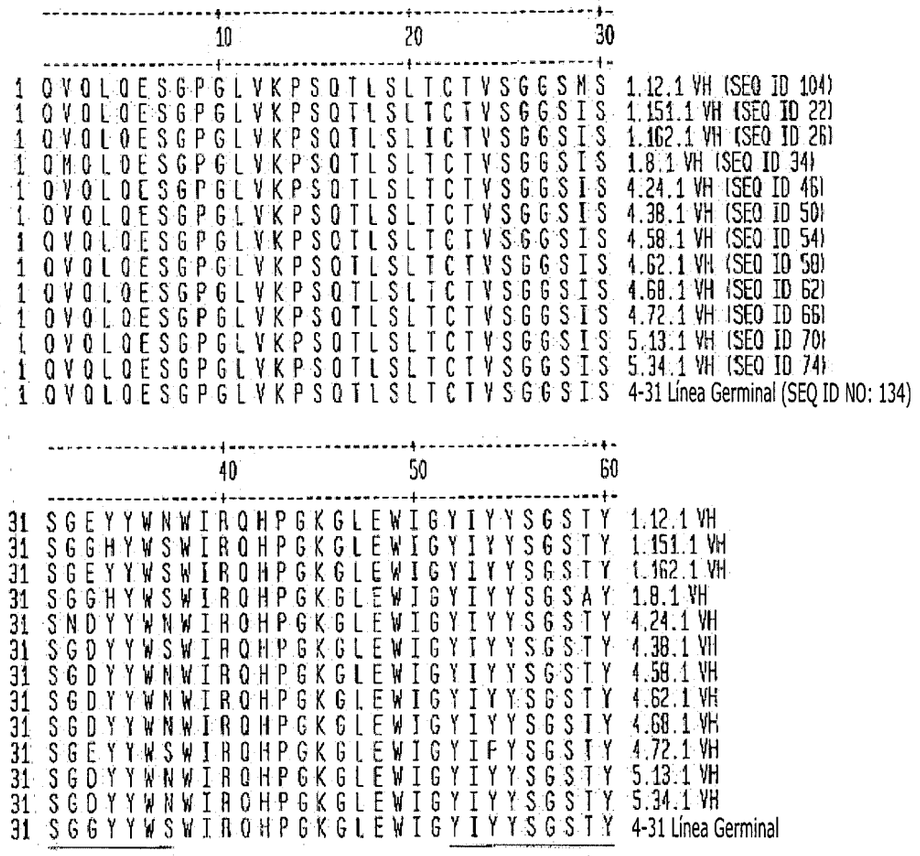

10 20 30
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSMS 1.12.1 VH (SEQ ID 104)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 1.151.1 VH (SEQ ID 22)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLICTVSGGSIS 1.162.1 VH (SEQ ID 26)
1 QMQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 1.8.1 VH (SEQ ID 34)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 4.24.1 VH (SEQ ID 46)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 4.38.1 VH (SEQ ID 50)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 4.58.1 VH (SEQ ID 54)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 4.62.1 VH (SEQ ID 58)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 4.68.1 VH (SEQ ID 62)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 4.72.1 VH (SEQ ID 66)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 5.13.1 VH (SEQ ID 70)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 5.34.1 VH (SEQ ID 74)
1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS 4-31 Línea Germinal (SEQ ID NO: 134)
40 50 60
31 SGEYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 1.12.1 VH
31 SGGHYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 1.151.1 VH
31 SGEYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 1.162.1 VH
31 SGGHYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSAY 1.8.1 VH
31 SNDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 4.24.1 VH
31 SGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 4.38.1 VH
31 SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 4.58.1 VH
31 SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 4.62.1 VH
31 SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 4.68.1 VH
31 SGEYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIFYSGSTY 4.72.1 VH
31 SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 5.13.1 VH
31 SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 5.34.1 VH
31 SGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 4-31 Línea Germinal

FIG. 7D

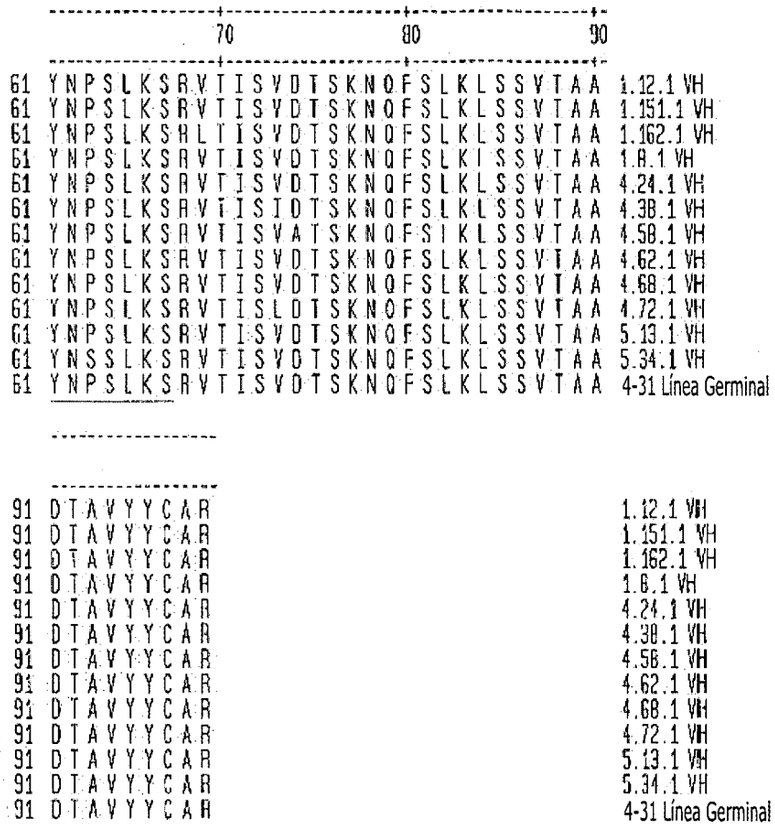

70
80
90
61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA 1.12.1 VH
61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA 1.151.1 VH
61 YNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA 1.162.1 VH
61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKISSVTAA 1.8.1 VH
61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA 4.24.1 VH
61 YNPSLKSRVTISIDTSKNQFSLKLSSVTAA 4.38.1 VH
61 YNPSLKSRVTISVATSKNQFSIKLSSVTAA 4.58.1 VH
61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA 4.62.1 VH
61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA 4.68.1 VH
61 YNPSLKSRVTISLDTSKNQFSLKLSSVTAA 4.72.1 VH
61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA 5.13.1 VH
61 YNSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA 5.34.1 VH
61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA 4-31 Línea Germinal
91 DTAVYYCAR 1.12.1 VH
91 DTAVYYCAR 1.151.1 VH
91 DTAVYYCAR 1.162.1 VH
91 DTAVYYCAR 1.8.1 VH
91 DTAVYYCAR 4.24.1 VH
91 DTAVYYCAR 4.38.1 VH
91 DTAVYYCAR 4.58.1 VH
91 DTAVYYCAR 4.62.1 VH
91 DTAVYYCAR 4.68.1 VH
91 DTAVYYCAR 4.72.1 VH
91 DTAVYYCAR 5.13.1 VH
91 DTAVYYCAR 5.34.1 VH
91 DTAVYYCAR 4-31 Línea Germinal

FIG. 8

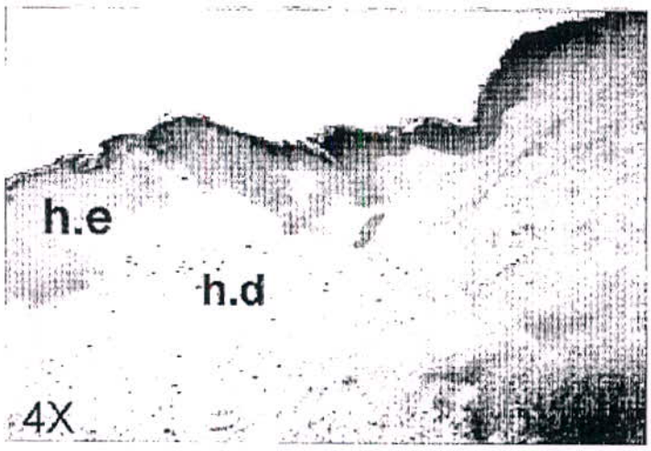


FIG. 9A

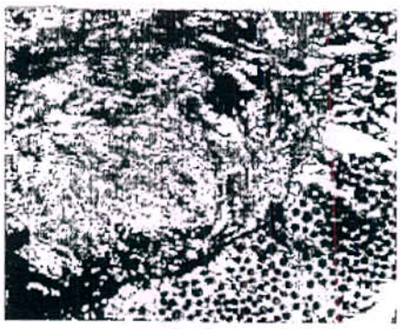


FIG. 9B



FIG. 10

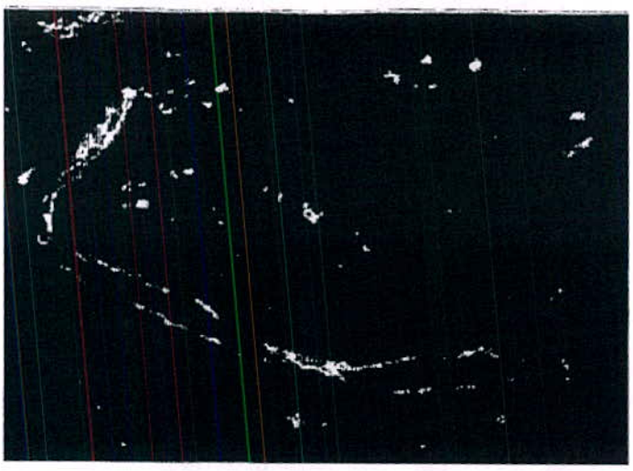


FIG. 11

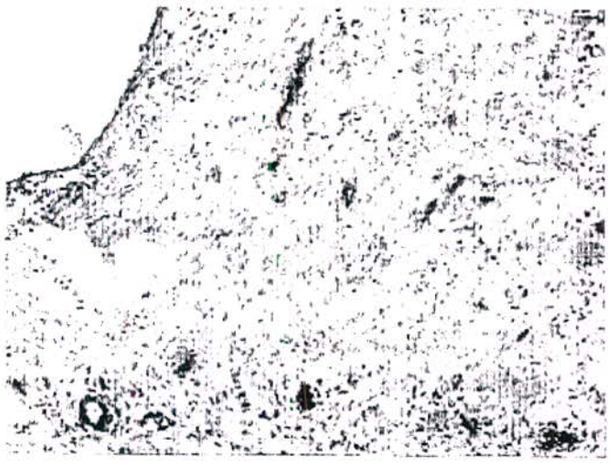


FIG. 12

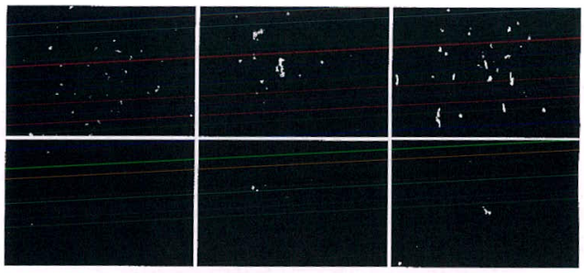

IgG HUMANO DE CONTROL
10mg/kg, IV
1.12.1(M29I/D19A)
10mg/kg, IV
CD31 HUMANO-ROJO
CD31 RATÓN-VERDE
MAGNIFICACIÓN: 20X

FIG. 13

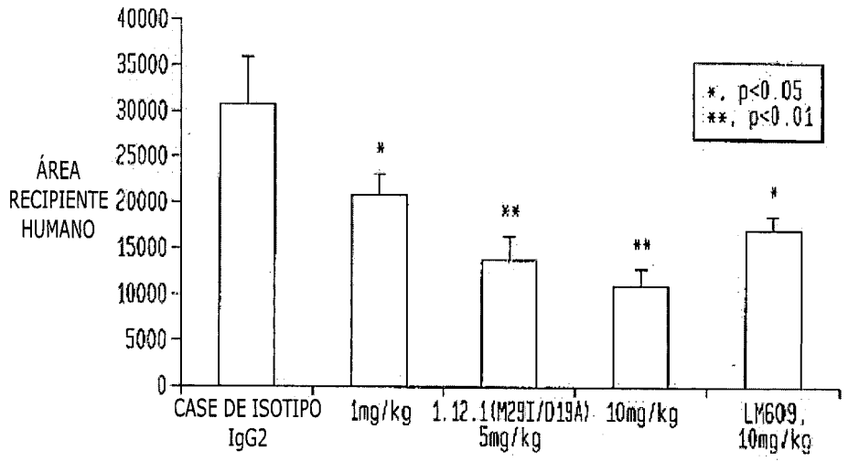
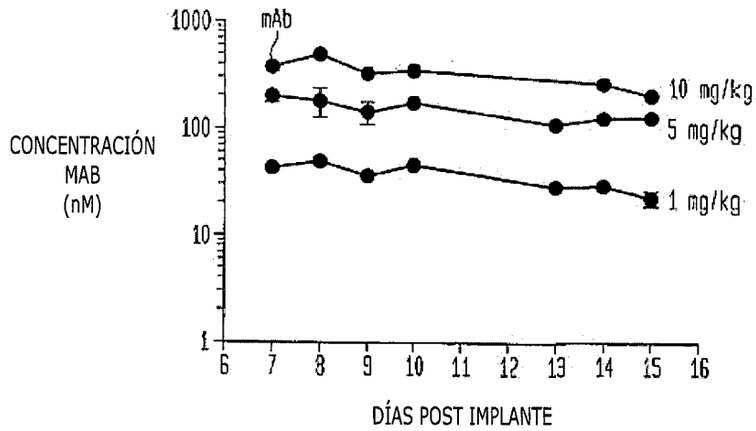
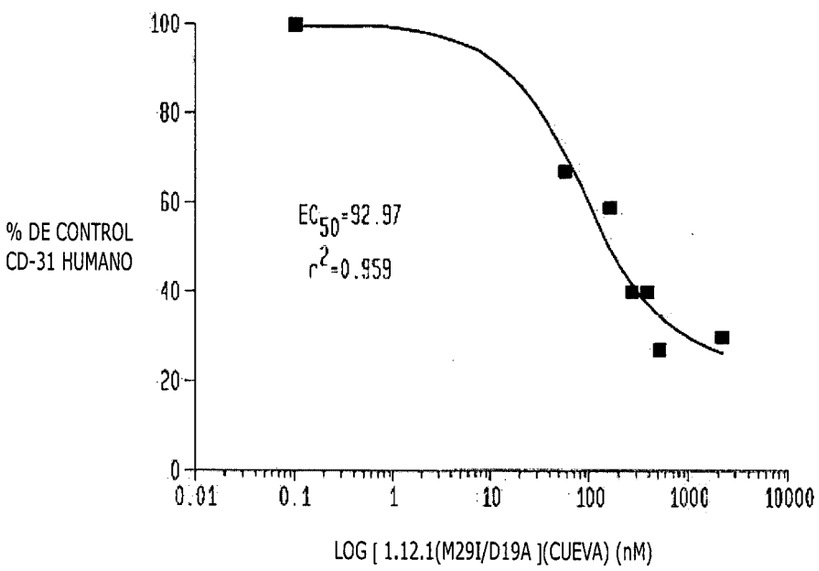

40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
ÁREA RECIPIENTE HUMANO
*, p<0.05
**, p<0.01
*
**
**
*
CASE DE ISOTIPO IgG2
1mg/kg
1.12.1(M29I/D19A) 5mg/kg
10mg/kg
LM609, 10mg/kg

FIG. 14


1000
100
10
1
CONCENTRACIÓN MAB (nM)
mAb
10 mg/kg
5 mg/kg
1 mg/kg
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
DÍAS POST IMPLANTE

249

FIG. 15


% DE CONTROL
CD-31 HUMANO
100
80
60
40
20
0
EC50=92.97
r2=0.959
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
LOG [1.12.1(M29I/D19A)(CUEVA) (nM)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Pfizer Inc
Amgen Fremont Inc.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS PARA CINASA-1 SIMILAR AL RECEPTOR ACTIVIN

<130> ABX-PF9 PROV

<140> 60/715,292
<141> 2005-09-07

<160> 136

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1332
<212> ADN
<213> Humano

<400> 1

caggtgcagc tgcaggagtc gggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgaat actactggaa ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagtacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300

tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360

accaagggcc catcggtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480

tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540

tactccctca gcagcgtagt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600

tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaatgt 660

tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 720

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 780

gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840

gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 900

agcgtcctca ccgtcgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960

tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1020

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 1200

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1320

tctccgggta aa 1332

<210> 2
<211> 444
<212> PRT
<213> Humano

<400> 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 3
<211> 645
<212> ADN
<213> Humano

<400> 3
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 4
<211> 215
<212> PRT
<213> Humano

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 5
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 5
caggtgcagc tgcaggagtc gggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgaat actactggaa ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagtacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300

tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 6

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 7
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 361
<212> ADN
<213> Humano

<400> 9
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agtcatggca tgtactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag 300

gagcagtggc ccgatgtttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 360

g 361

<210> 10

<211> 120
<212> PRT
<213> Humano

<400> 10

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Glu Gln Trp Pro Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 322
<212> ADN
<213> Humano

<400> 11
gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggcattaga aattatttag cctggtttca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagtccct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Humano

<400> 12

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

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

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 13
caggtgcacc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgg 120

cagccccccg ggaagggact ggagtggatt gggtatatct attacagtgg gagcaccaac 180

tacaaccccc ccctcaagag tcgaatcacc atatcaatag acacgtccaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgaactctgt gaccgctgcg gacacggcct tgtattactg tgcgagagaa 300

tcagtggccg cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 14

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 15
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agtaggtact tagcctggta ccagcaggaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcaa cactatggta gctcaccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 355
<212> ADN

<213> Humano

<400> 17
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgg 120

cagccccccag ggaagggact ggagtggatt gggtatatct attacagtgg gagcaccaac 180

tacaaccccct ccctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300

gcagtgtccg cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 18
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 18

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 19
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agtacctact tagcctggca ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgtatcca gcagggccag tggcgtccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcaccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 20

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 370
<212> ADN
<213> Humano

<400> 21
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtc actactggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagttctgt gactgccgcg gacacggccg tatattactg tgcgagagcg 300

gggcgatttt tggagtggtc tgatgttttt gatatctggg gccaagggac aatggtcacc 360

gtctcctcag 370

<210> 22
<211> 123
<212> PRT
<213> Humano

<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ala Gly Arg Phe Leu Glu Trp Ser Asp Val Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
<211> 340
<212> ADN
<213> Humano

<400> 23
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aagctgctca tttactgggc atctacccgg 180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatgatact 300

cctccgacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac 340

<210> 24
<211> 113
<212> PRT
<213> Humano

<400> 24

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asp Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 25
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 25
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcacagac cctgtccctc 60

atctgtactg tttctggtgg ctccatcagc agtggtgaat actactggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgacttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300

gggatcggtg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcag 355

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 26

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

Thr Leu Ser Leu Ile Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Ile Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 27
gaaattgtgt tgacgcagtc gccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcctaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcat cagactggac 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cggtatggta gctcaccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 28

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ile Arg Leu Asp
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 29
<211> 361
<212> ADN
<213> Humano

<400> 29

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agaggacgat 300

agcagtggct gcccctactt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgcttcctca 360

g 361

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Humano

<400> 30

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Asp Asp Ser Ser Gly Cys Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Ala Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 322
<212> ADN
<213> Humano

<400> 31
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccagggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagtc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccattcac tttcggccct 300

gggaccaaag tggatatcaa ac 322

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> Humano

<400> 32

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 33
<211> 370
<212> ADN
<213> Humano

<400> 33
cagatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgcagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtc actactggag ctggatccgc 120

cagcaccccg ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcgcctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagcg 300

gggcgatttt tggagtggtc tgatgttttt gatatctggg gccaagggac aatggtcacc 360

gtctctttag 370

<210> 34
<211> 123
<212> PRT
<213> Humano

<400> 34

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ala Gly Arg Phe Leu Glu Trp Ser Asp Val Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Leu
115 120

<210> 35
<211> 340
<212> ADN
<213> Humano

<400> 35
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttaact 120

tggtaccagc agaaaccagg acggcctcct aagctgctca tttactgggc atctacccgg 180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaata ttataatact 300

cctccgacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaagc 340

<210> 36
<211> 113
<212> PRT
<213> Humano

<400> 36

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asn Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 37
<211> 379
<212> ADN
<213> Humano

<400> 37
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtaatac catatactac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaggaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagggaagcc 300

tatgatagta gtggttacta ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctcag 379

<210> 38
<211> 126
<212> PRT
<213> Humano

<400> 38

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ala Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 39
<211> 337
<212> ADN
<213> Humano

<400> 39
gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta cttgtattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccggttc 180

tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgacaatc 240

agccgggtgg aggctgacga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtac acaccttcct 300

tggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaac 337

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> Humano

<400> 40

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Thr His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 376
<212> ADN
<213> Humano

269

<400> 41
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggtc ccttagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaagtgatgg tgggacaaca 180
gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
gggaattact atgatggtag tggttattac tcttttgact actggggcca gggaaccctg 360
gtcaccgtct cctcag 376

<210> 42
<211> 125
<212> PRT
<213> Humano

<400> 42

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Ser Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Gly Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Phe
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43
<211> 337
<212> ADN
<213> Humano

<400> 43
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300

cccactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaac 337

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> Humano

<400> 44

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 45
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 45
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtaatgatt actactggaa ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300

tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 46
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 46

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 47
gaaaatgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcttcca gcggggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cattatggta gctcaccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 48
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 48

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Gly Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 49
<211> 361
<212> ADN
<213> Humano

<400> 49
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcaatag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300

cgtgactacg gtggtggctt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

g 361

<210> 50
<211> 120
<212> PRT
<213> Humano

<400> 50

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 340
<212> ADN
<213> Humano

<400> 51
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca tcaataagat ctacttagct 120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctacccgg 180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaccaata ttatagtact 300

ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac 340

<210> 52
<211> 113
<212> PRT
<213> Humano

<400> 52

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 53
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 53

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atttcagtag ccacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300

gctacggagg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 54
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 54

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Ala Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Thr Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 55
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagggccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc accacctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcactgta ttactgtcag cactatggta cctcatcgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 56
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 56

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Thr
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 57
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 57
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300

tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 58
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 58

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 59
gaaagtgtgt tgacgcagtc tcctggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgtttcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 60
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 61
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 61
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300

gatattgcag gattcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 62

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Ile Ala Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 63
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctac ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gactccactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtata ttactgtcag cagtatggta gctcacctat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 64
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 64

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 65
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 65
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgaat actactggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtatatct tttacagtgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcactag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300

tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 66
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 66

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 67
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcggaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgtatcca gtagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caatatggta gctcaatgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 68

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Met
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 69
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 69
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300

ggcctcgagg cttttgatat ctggggtcaa gggacaatgg tcaccgactc ttcag 355

<210> 70
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 70

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Leu Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Asp Ser Ser
115

<210> 71
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 71
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg ctctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ctactgtcag cattatggta gctcacttct cactttcggc 300

ggagggacca aggtggagat caaac 325

<210> 72
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 72

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 73
<211> 355
<212>
<213>

<400> 73
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tacaactcgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300

ggccagaacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 74
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 74

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Gln Asn Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 340
<212> ADN
<213> Humano

<400> 75
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaggtac acactggcct 300

ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac 340

<210> 76
<211> 113
<212> PRT
<213> Humano

<400> 76

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 77
<211> 358
<212> ADN
<213> Humano

<400> 77
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggGtc ccttagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180

gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300

ggggatggaa cgcactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcag 358

<210> 78

<211> 119
<212> PRT
<213> Humano

<400> 78

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Gly Asp Gly Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
<211> 322
<212> ADN
<213> Humano

<400> 79
gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac 60

atctcctgca aagccagcca agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca 120

ggagaagctg ctattttcat tattcaagaa gctactactc tcgttcctgg aatcccacct 180

cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct 240

gaggatgctg catattactt ctgtctacaa catgataatt tcccgctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> Humano

<400> 80

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 81
<211> 379
<212> ADN
<213> Humano

<400> 81
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtagtac cacatactac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa gtcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggg 300

tatagcagtg gctggtacga ggactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctcag 379

<210> 82
<211> 126
<212> PRT
<213> Humano

<400> 82

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Glu Asp Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 83
<211> 337
<212> ADN
<213> Humano

<400> 83
gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtttagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccggttt 180

tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaac 337

<210> 84
<211> 112
<212> PRT
<213> Humano

<400> 84

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Phe Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Ile Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 85

<211> 388
<212> ADN
<213> Humano

<400> 85
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gacttctaca tgagctggat ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggaatg gatttcatac attagtagta gtggtagtac catttactac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatg tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attattgtgc gagagaagga 300

tactatgatt cggggagtta ttataaggac tacgactact acggtatgga cgtctggggc 360

caagggacca cggtcaccgt ctcctcag 388

<210> 86
<211> 129
<212> PRT
<213> Humano

<400> 86

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys Asp Tyr Asp
100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 87
<211> 337
<212> ADN
<213> Humano

<400> 87

gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccggttc 180
tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300
cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaac 337

<210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> Humano

<400> 88

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Ile Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 89
<211> 379
<212> ADN
<213> Humano

<400> 89
caggtgcggc tggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtatttc catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaagga 300
tatagcagct cgtcacatta ctacgactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctcctcag 379

<210> 90
<211> 126
<212> PRT
<213> Humano

<400> 90

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ile Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Ser Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 91
<211> 337
<212> ADN
<213> Humano

<400> 91
gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gcctccacag gtccttatct atgaagtttc caaccggttc 180

tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtac acagcttcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaac 337

<210> 92
<211> 112
<212> PRT
<213> Humano

<400> 92

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Thr Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 93
<211> 503
<212> PRT
<213> **Mono Cinomólogo**

<400> 93

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Arg Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala
1 5 10 15

Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val
20 25 30

Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Arg Gly Pro Thr Cys Gln Gly
35 40 45

Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln
50 55 60

Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg
65 70 75 80

Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn
85 90 95

Arg Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Thr Pro Ser Glu Gln
100 105 110

Pro Gly Thr Asp Ser Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala
115 120 125

Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Val Gly Leu Trp His Val Arg
130 135 140

Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser
145 150 155 160

Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Ser Met Leu Gly Asp
165 170 175

Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe
180 185 190

Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val
195 200 205

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu
210 215 220

Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe
225 230 235 240

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile
245 250 255

Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln
260 265 270

Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
275 280 285

Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val
290 295 300

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr
305 310 315 320

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val
325 330 335

Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
340 345 350

Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro
355 360 365

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln
370 375 380

Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala
385 390 395 400

Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly
405 410 415

Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp
420 425 430

Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr
435 440 445

Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu
450 455 460

Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu
465 470 475 480

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro
485 490 495

Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln
500

<210> 94
<211> 1512
<212> ADN
<213> Mono Cinomólogo

<400> 94
atgaccttgg gctccccgag gagaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt ggtgacccag 60
ggtgaccccg tgaagccctc tcggggcccg ctggtgacct gcacatgtga gagcccacat 120
tgcaggggcc ctacctgcca gggggcctgg tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg 180
aggcaccccc aggaacatcg gggctgcggg aacttgcaca gggagctctg caggggcgc 240
cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgt gacagccacc tctgcaaccg caacgtgtcc 300
ctggtgctgg aggccaccca aactccttcg gagcagccgg gaacagacag ccagctggcc 360
ctgatcctgg gccccgtgct ggccttgctg gccctggtgg ccctgggtgt cgtgggcctg 420
tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cggggcctgc acagcgagct gggagagtcc 480
agtctcatcc tgaaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt 540
gactgcacca cagggagtgg ctcggggctc cccttcctgg tgcagaggac agtggcacgg 600
caggttgcct tggtggagtg tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcttg 660
tggcacggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggacgaaca gtcctggttc 720
cgggagactg agatctacaa cacagtgttg ctcagacacg acaacatcct aggcttcatc 780
gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagctgt ggctcatcac gcattaccac 840
gagcacggct ccctctacga ctttctgcag agacagacgc tggagccgca tttggctctg 900
aggctagctg tgtccgcagc ctgtggcctg gcacacctgc acgtggagat cttcggtaca 960
cagggcaaac cggccattgc ccaccgtgac ttcaagagcc gcaacgtgct ggtcaagagc 1020
aacctgcagt gttgcattgc tgacctgggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgat 1080
tacctggaca tcggcaacaa cccgagagta ggcaccaaga ggtacatggc acccgaggtg 1140
ctggatgagc agatccgcac ggactgcttt gagtcctata agtggactga catctgggcc 1200
tttggcctgg tgctgtggga gatcgcccgc cggaccatcg tgaacggcat cgtggaggac 1260

tatagaccac ccttctatga tgtggtgccc aatgacccca gctttgagga catgaagaag 1320
gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggctggctgc agacccggtc 1380
ctctcaggcc tagctcagat gatgcgggag tgctggtacc caaacccctc tgcccgactc 1440
actgcgctgc ggatcaagaa gacactacag aaaattagca acagtccaga gaagcccaaa 1500
gtgattcagt ag 1512

<210> 95
<211> 1332
<212> ADN
<213> Humano

<400> 95
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatgagc agtggtgaat actactggaa ctggatccgc 120
cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagtacctac 180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaatgt 660
tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 720
cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 900
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 1200
ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320
tctccgggta aa 1332

<210> 96
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> El cebador delantero usado para clonación ECD de ALK-1

<400> 96
acggcccagc cggccgaccc tgtgaagccg tct 33

<210> 97
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> El cebador inverso usado para clonación ECD de ALK-1

<400> 97
actaagcttt taatgatgat gatgatgatg ctggccatct gttcccg 47

<210> 98
<211> 103
<212> PRT
<213> Humano

<400> 98

Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu
1 5 10 15

Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val
20 25 30

Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys
35 40 45

Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val
50 55 60

Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu
65 70 75 80

Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly
85 90 95

Gln His His His His His His
100

<210> 99
<211> 387
<212> ADN
<213> Humano

<400> 99
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gacgcggccc agccggccga ccctgtgaag ccgtctcggg gcccgctggt gacctgcacg 120

tgtgagagcc cacattgcaa ggggcctacc tgccgggggg cctggtgcac agtagtgctg 180

gtgcgggagg aggggaggca cccccaggaa catcggggct gcgggaactt gcacagggag 240

ctctgcaggg ggcgccccac cgagttcgtc aaccactact gctgcgacag ccacctctgc 300

aaccacaacg tgtccctggt gctggaggcc acccaacctc cttcggagca gccgggaaca 360

gatggccagc atcatcatca tcatcat 387

<210> 100
<211> 444
<212> PRT
<213> Humano

<400> 100

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ser Ser Gly
20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 101
<211> 645
<212> **ADN**
<213> **Humano**

<400> 101
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagacacc 60

ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 102
<211> 215
<212> PRT
<213> Humano

<400> 102

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

Glu Arg Asp Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 103
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 103
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatgagc agtggtgaat actactggaa ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagtacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300

tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 104
<211> 118
<212> PRT
<213> Humano

<400> 104

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ser Ser Gly
20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105

<211> 58
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de Amplificación Utilizado para Clonar 1.12.1 de Longitud Completa

<400> 105
tcttcaagct tgatatctct agaagccgcc accatgaaac acctgtggtt cttcctcc 58

<210> 106
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de Amplificación Utilizado para Clonar 1.12.1 de Longitud Completa

<400> 106
ttctctgatc agaattccta ctatttaccc ggagacaggg agaggc 46

<210> 107
<211> 48
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de Amplificación Utilizado para Clonar 1.12.1 de Longitud Completa

<400> 107
tcttcaagct tcccgggagc cgccaccatg gaaaccccag cgcagctt 48

<210> 108
<211> 49
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de Amplificación Utilizado para Clonar 1.12.1 de Longitud Completa

<400> 108
ttctttgatc agaattctca ctaacactct cccctgttga agctctttg 49

<210> 109
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Mutagénico

<400> 109
ctccagggga aagagccacc ctctcctgta gg 32

<210> 110
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Mutagénico

<400> 110
cctacaggag agggtggctc tttcccctgg ag 32

<210> 111
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Mutagénico

<400> 111
ggtggctcca tcagcagtgg tgaatactac 30

<210> 112
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Mutagénico

<400> 112
gtagtattca ccactgctga tggagccacc 30

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Humano

<400> 113

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
1 5

<210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> Humano

<400> 114

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
1 5

<210> 115
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Delantero

<400> 115
agcgggccca gagggaccat g 21

<210> 116
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Inverso

<400> 116

cagaaaggaa tcaggtgctc ctgggcta 28

<210> 117
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Delantero

<400> 117
gattatggcc ttgggctccc ccaggaaa 28

<210> 118
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Inverso

<400> 118
gggctattga atcactttag gcttctctgg actgttg 37

<210> 119
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda TaqMan (ID1-Sonda)

<400> 119
ccagcacgtc atcgactaca tcaggga 27

<210> 120
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda PCR TaqMan (ID1-F)

<400> 120
aaggtgagca aggtggagat tc 22

<210> 121
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda PCR TaqMan (ID1-R)

<400> 121
ttccgagttc agctccaact g 21

<210> 122
<211> 25
<212> PRT
<213> Humano

<400> 122

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 123
<211> 12
<212> PRT
<213> Humano

<400> 123

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 124
<211> 25
<212> PRT
<213> Humano

<400> 124

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 125
<211> 12
<212> PRT
<213> Humano

<400> 125

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 126
<211> 325
<212> ADN
<213> Humano

<400> 126
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagacacc 60

ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 127
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 127

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

Glu Arg Asp Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 128
<211> 1332
<212> ADN
<213> Humano

<400> 128
caggtgcagc tgcaggagtc gggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatgagc agtggtgaat actactggaa ctggatccgc 120
cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagtacctac 180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaatgt 660
tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 720
cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 900
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960

tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 1200
ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320
tctccgggta aa 1332

<210> 129
<211> 355
<212> ADN
<213> Humano

<400> 129
caggtgcagc tgcaggagtc gggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatgagc agtggtgaat actactggaa ctggatccgc 120
cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagtacctac 180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 130
<211> 503
<212> PRT
<213> Humano

<400> 130

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala
1 5 10 15

Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val
20 25 30

Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly
35 40 45

Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln
50 55 60

Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg
65 70 75 80

Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn
85 90 95

His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln
100 105 110

Pro Gly Thr Asp Gly Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala
115 120 125

Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Leu Gly Leu Trp His Val Arg
130 135 140

Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser
145 150 155 160

Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Thr Met Leu Gly Asp
165 170 175

Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe
180 185 190

Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val
195 200 205

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu
210 215 220

Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe
225 230 235 240

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile
245 250 255

Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln
260 265 270

Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
275 280 285

Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val
290 295 300

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr
305 310 315 320

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val
325 330 335

Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
340 345 350

Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro
355 360 365

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln
370 375 380

Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala

385 390 395 400

Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly
405 410 415

Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp
420 425 430

Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr
435 440 445

Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu
450 455 460

Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu
465 470 475 480

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro
485 490 495

Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln
500

<210> 131
<211> 120
<212> PRT
<213> Humano

<400> 131

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Ile Ala Val Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 132
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 132

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 133
<211> 96
<212> PRT
<213> Humano

<400> 133

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

<210> 134
<211> 99

<212> PRT
<213> Humano

<400> 134

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg

<210> 135
<211> 108
<212> PRT
<213> Humano

<400> 135

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Phe Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 136

<211> 5
<212> PRT
<213> Humano

<400> 136

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

225
310 326

00621
0827

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by **Norman Goodman**

3. acting in the capacity of **County Clerk**

4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At Albany, New York 6. the 21st day of November 2001

7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York

8. No. A-85700E

9. Seal/Stamp 10. Signature

Howard J Carr

Howard J. Carr
Special Deputy Secretary of State

TRADUCCION No.: 61/2/01
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

04135595.RSL (REV: 2/6/96)

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª Nº 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

311
326
324

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)
Pfizer Inc.

of/domiciliado (s) en
235 E. 42nd Street, 20th Floor
New York, New York 10017-5755, U.S.A.

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy
8th Day of October, 2001

in/en New York, NY, U.S.A.

Signature / Firma
J. Trevor Lumb
Asst. Gen. Patent Counsel

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODERE-3 (MINUTA Nº 12.1.1.2.6 USA)

TRADUCCION No: 01.12la
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial

312 324 320

CLERK
NEW YORK
COUNTY

State of New York
County of New York, ss.:

255074 Form 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

Roy J. Waldron

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

NOV 16 2001

FEE PAID $3.00

TRADUCCION No.: 01/12/01
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2079

County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

313

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los ___ días del mes de OCTUBRE de 19 2001

ante mí, Notario Público de l Estado de Nueva York, NY EEUU

compareció(eron) personalmente J. Trevor Lumb

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 8th day of October, 2001

before me, a Notary Public of State of New York, NY, USA

personally appeared J. Trevor Lumb

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document and who has(have) legal capacity to execute it.

Roy F. Waldron
Notary Public, State of New York
No. 02WA6030057
Qualified in New York County
Commission Expires September 7, 20 05

Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 8 de Octubre de 19 2001

compareció(eron) ante mí J. Trevor Lumb

a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía denominada Pfizer Inc.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

ARTICULOS DE CONSTITUCION, 30 OCTUBRE 1997

NOTIFICACION DE ACCION DEL COMITE ADMINISTRATIVO, 16 ENERO, 2001

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Pfizer Inc.

es una Sociedad/Compañía legalmente constituída y existente de acuerdo con las leyes de Delaware, EEUU.,

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es Nueva York, NY EEUU

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) J. Trevor Lumb

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Nueva York
Estado Nueva York
Hoy 8 Octubre de 19 2001

COUNTY

Notario Público

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 8th day of October, 2001

appeared before me J. Trevor Lumb

who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named Pfizer Inc

I Certify:

1. That I have seen the following documents:*

Certificate of Incorporation, October 30, 1997

Notification of Corporate Management Committee Action, January 16, 2001

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Pfizer Inc

is a Corporation/Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of Delaware, USA

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is New York, NY, USA

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) J. Trevor Lumb

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City New York
State New York
This 8th day of October, 2001

Roy F. Waldron
Notary Public, State of New York
No. 02WA6030057
Qualified in New York County
Commission Expires September 7, 20 05

Notary Public

* Documents must be identified with date and origin.

TRADUCCION No.: 01-12161
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 01.12/01 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial debidamente aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

(A continuación se traducen las legalizaciones de un documento de Representación y Poder escrito en inglés y español, por el cual **PFIZER INC.**, domiciliada en 235 E. 42nd Street, 20th Floor, New York, New York 10017-5755, Estados Unidos, otorga poder a **GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ.**) Dado y firmado el 8 de octubre de 2001 en Nueva York, Nueva York, EUA. (Firma ilegible), J. Trevor Lumb, Asistente General del Asesor de Patentes.

CERTIFICADO NOTARIAL -INDIVIDUO- otorgado en inglés y español certificando la firma de J. Trevor Lumb y su capacidad legal para otorgar el anterior poder. (Firma ilegible), Notario Público. (Sello en tinta) Roy F. Waldron, Notario Público, Estado de Nueva York, No. 02WA6030057, Calificado en el Condado de Nueva York, Comisión expira el 7 de septiembre de 2005. (Sello seco ilegible).

CERTIFICADO NOTARIAL -SOCIEDAD- otorgado en inglés y español referente a la existencia legal de **PFIZER INC.** Dado en la ciudad de Nueva York, en el Estado de Nueva York, el 8 de octubre de 2001. (Firma ilegible), Notario Público. (Sello en tinta) Roy F. Waldron, Notario Público, Estado de Nueva York, No. 02WA6030057, Calificado en el Condado de Nueva York, Comisión expira el 7 de

septiembre de 2005. (Sello seco ilegible)

Estado de Nueva York) 255074

Condado de Nueva York) ss

Yo, NORMAN GOODMAN, Escribano de Condado y Escribano de la Suprema Corte del Estado de Nueva York, en y para el Condado de Nueva York, una Corte de registro que por ley tiene un sello, POR EL PRESENTE CERTIFICO de acuerdo con la ley ejecutiva del Estado de Nueva York, que ROY F. WALDRON, cuyo nombre suscribe la declaración juramentada, declaración, certificado de reconocimiento o prueba adjunta, era en el momento de tomarla un NOTARIO PÚBLICO en y para el Estado de Nueva York, debidamente comisionado, juramentado y calificado para actuar como tal; que de acuerdo con la ley, una comisión o certificado de su carácter oficial, con firma autógrafa, ha sido registrada en mi oficina; que estoy familiarizado con la escritura de dicho NOTARIO PÚBLICO o he comparado la firma del instrumento adjunto con su firma autógrafa depositada en mi oficina y creo que dicha firma es genuina.

EN FE DE LO CUAL, he firmado e impuesto el sello oficial hoy 16 de noviembre de 2001.

(Firma facsimilar ilegible), Escribano de Condado y Escribano de la Corte Suprema, Condado de Nueva York. (Sello en tinta del Escribano de Condado).

316

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 **Norman Goodman**

3. Actuando en su capacidad de **Escribano de Condado**

4. Lleva el sello/timbre del Condado de **Nueva York**

CERTIFICADO

5. En Nueva York, Nueva York.

6. el 21 de noviembre de 2001

7. Por el Subsecretario de Estado Especial, Estado de Nueva York

8. No. A-85700E.

9. Sello: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE NUEVA YORK.

10. Firma (Firma ilegible) Howard J. Carr, Subsecretario de Estado Especial

---

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 12889-801-001-1

ID. 5

DIC. 11/01

María E. Martelo
TRADUCCION No.: 012701
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR María Elvira Martelo
IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)
ES(SON) AUTENTICA(S)
SANTAFE DE BOGOTA, 11 DEC 2001
NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ BARRIAS
Notario Sexto Encargado

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

200704

María Elena Morales

SUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 DEC 11 A 11:08

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

CAVELIER
ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

317 333

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : **PFIZER INC.**

Poder conferido el : 08/10/2001

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. N° 31.929
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. N° 23.555
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C. 04 NOV 2009

Ante mi AMPARO QUINTERO ARTURO,
NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
BOGOTÁ, D.C.

Compareció(eron) Emilio Williamson Ferrero

Juez Clemencia Suarez De Paez

Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C. 138019 T.P. 31929
3541634 T.P. 23111

Y declaró(eron) que la(s) firma(s) que aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que el contenido del mismo es cierto.

En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrero
Juez Clemencia Suarez

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arturo
NOTARIA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

4359

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

348 - 335 334

15413
6606

REPRESENTATION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

AMGEN FREMONT INC., a corporation organized and existing under the laws of the State of Delaware, U.S.A. domiciliado (s) en/of 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555, United States of America
National Phase of International Application No. PCT/US2005/000370

hereby ratify the Patent Application No. 06.077.165 filed by Emilio Ferrero on August 4, 2006.

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters

© CAVELIER ABOGADOS

319 324 355

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 20 días del mes de OCTUBRE de 2006 ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado de California, EUA
Stuart L. Watt
a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que preced, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 20th day of October 2006 before me, a Notary Public or Attesting Official of California, USA
personally appeared Stuart L. Watt
to me known, and known to me to be the person(~~s~~) who executed that foregoing document, and who has(~~have~~) legal capacity to execute it.

_____ Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official Debra L. Merrill

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 20 de OCTUBRE de 2006
Compareció(eron) ante mi STUART WATT
quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía denominada AMGEN FREMONT INC.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*
CERTIFICADO DE FUSION & ACTAS DE LA JUNTA DIRECTIVA DE AMGEN FREMONT INC.
2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:
2.1. Que AMGEN FREMONT INC.
es una Sociedad/Compañía legalmente constituída y existente de acuerdo con las leyes de ESTADO DE DELAWARE
2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es FREMONT, CALIFORNIA
2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.
2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) STUART L. WATT
está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.
Ciudad THOUSANDS OAKS
Estado CALIFORNIA
Hoy 20 OCTUBRE de 2006

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 20th day of October 2006 appeared before me
Stuart Watt
who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named
AMGEN FREMONT INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents:*
State of Delaware Certificate of Merger & Minutes of Action of the Board of Directors of Amgen Fremont Inc.
2. That the above documents duly prove the following:
2.1. That Amgen Fremont Inc.
is a Corporation/Company legally constituted and in existence in accordance with the laws the State of Delaware
2.2. That the domicile of said Corporation/Company is State of California
2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.
2.4. That Mr.(Messrs.) Stuart L. Watt
is(~~are~~) authorized to grant the present Power of Attorney.
City Thousand Oaks
State California
This 20th day of October 2006

_____ Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official Debra L. Merrill

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

DEBRA L. MERRILL
Commission # 1420776
Notary Public - California
Ventura County
My Comm. Expires May 30, 2007

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

ABX-PF/6
ABX-0109

320 335 336

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 9th day of November 2006*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 323785*
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature*



Bruce McPherson

Secretary of State

BY

NP-24 A (REV. 4-05)

OSP 05 90772

promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this October 20, 2006

en/in Thousand Oaks, California, U.S.A.

por/by Stuart Watt, Vice President, Law

Firma Stuart L. Watt Signature

Subscribed and sworn before me, Debra L. Merrill

a Notary Public, this 20th day of October, 2006

Debra L. Merrill
Notary Public

DEBRA L. MERRILL
Commission # 1420776
Notary Public - California
Ventura County
My Comm. Expires May 30, 2007

© CAVELIER ABOGADOS

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 15/11.06 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual **AMGEN FREMONT INC.**, una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMÁN CAVELIER**.

Dado y firmado el 20 de octubre de 2006

Por: Stuart Watt, Vicepresidente Jurídico

Firma [Firmado] Stewart L. Watt.

Suscrito ante mí, Debra L. Merrill, Notario público, hoy 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill

Notario público

DEBRA L MERRILL
Comisión # 1420776
Notario Público – California
Condado de Ventura
Mi comisión expira el 30 de mayo de 2007

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO) en inglés y español referente a la firma de **Stewart L. Watt**. Dado el 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill, Notario Público.

323 ~~330~~ ~~331~~

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **Amgen Fremont Inc**. Dado en la

Ciudad: Thousand Oaks

Estado: California

El 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill, Notario Público.

[Firmado] Debra L. Merrill

Notario público

DEBRA L MERRILL
Comisión # 1420776
Notario Público – California
Condado de Ventura
Mi comisión expira el 30 de mayo de 2007

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

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

1. País*: Estados Unidos de América*

   Este documento público

2. *ha sido firmado por Debra L. Merrill*

3. *en su capacidad de Notario Público, Estado* de California

4. *lleva el sello/timbre de Debra L. Merrill, Notario Público, Estado de California*

CERTIFICADO

5. *en Sacramento, California*

6. *el 9 de noviembre de 2006*

7. *por el Subsecretario de Estado, Estado de California*

8. *No.* **323785**

9. *Sello/Timbre*: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.

10. Firma (Firma llegible), Secretario de Estado

Por: [Firma ilegible]

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

María E. Martelo
TRADUCCION No.: 15 11 06
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COLO 10097-704-001-1

WPC 10097 - ID 10

OCT 23/06

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

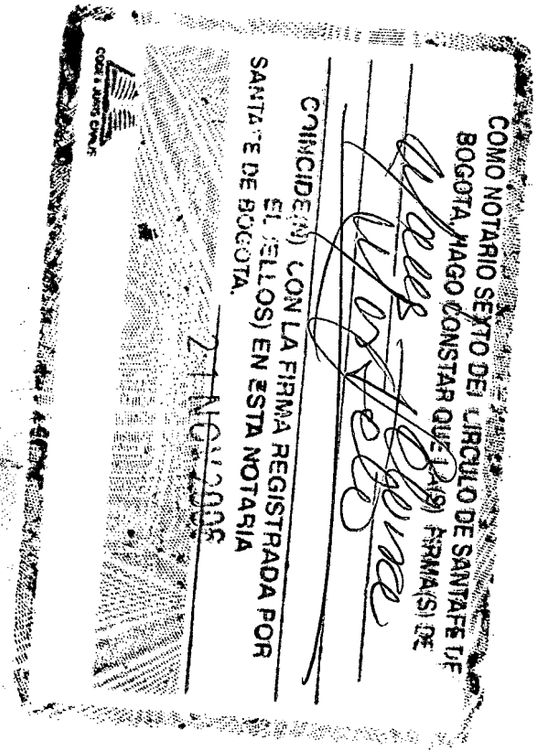
527255

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 NOV 21 P 2:09

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



325 340 341

5. *en Sacramento, California*

6. *el 9 de noviembre de 2006*

7. *por el Subsecretario de Estado, Estado de California*

8. *No.* **323785**

9. *Sello/Timbre*: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.

10. Firma (Firma Ilegible), Secretario de Estado

Por: [Firma ilegible]

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

María E. Martelo
TRADUCCION No.: 15 11.06
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COLO 10097-704-001-1

WPC 10097 - ID 10

OCT 23/06

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

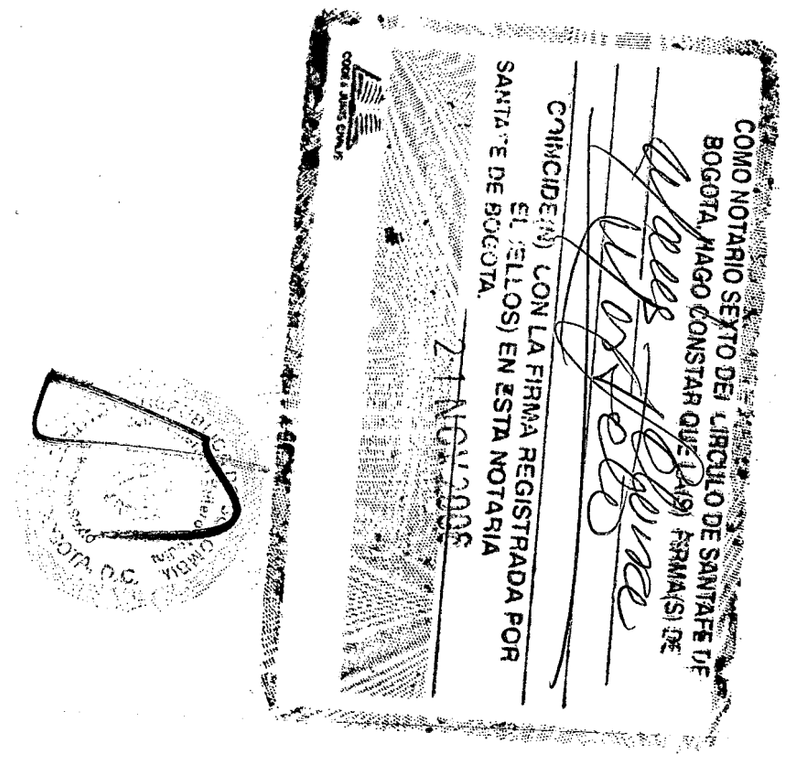
527255

COTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 NOV 21 P 2:09

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



CAVELIER
ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

326

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : AMGEN FREMONT INC

Poder conferido el : 20/10/2006

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

EMILIO FERRERO
T.P.A. N° 31.929
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. N° 23.555
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogotá, D.C. 03 NOV 2009
Ante el
NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE
BOGOTÁ D.C.
Compareció (eron) Emilio Fonseca
Luz Clemencia de Paez.
Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.
C.C. 4.380.197 de Tunja.
C.C. 35.456.344 de Bogotá.
Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Fonseca
Luz Clemencia Paez

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Jaime Varón Olmbo
NOTARIO
ENCARGADO
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

:327 348

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0095941

Bogotá D.C., Septiembre 18 de 2012 - 11:52:35

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	493023252	18/09/2012	11.235.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	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. 08-034643-A-00000-0000
Fecha: 2013-01-09 16:23:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 328

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-034643- -00007-0000
Fecha: 2012-09-21 16:36:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 345 345

COLO: 1J413-84J-006-8.

328 344

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0096769

Bogotá D.C., Septiembre 20 de 2012 - 11:23:50

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	91220	05/09/2012		345.000.00
RECIBO DE CA	999999999	96165	18/09/2012		15.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
12	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	360.000.00
				$360.000.00

SON: **TRESCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente N

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-034643-A-00000-0000
Fecha: 2013-01-09 16:23:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 328

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-034643- -00007-0000
Fecha: 2012-09-21 16:36:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 343 345

$ 30.000 x 12 = $ 360.000:

COLO: 1543-841-006-8.