



No. 07-012528- -00008-0000

Fecha: 2012-05-31 16:11:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 328

Act. 523 RESPUESTA Folios: 326

As. 102976

Señor

DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

REF: Expediente No. 07 012528 solicitud de patente de invención a favor
de GENENTECH, INC Título ANTICUERPOS ANTI-MET

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al oficio número 01050 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 26 de enero de 2012.

En primer lugar, deseamos modificar el título de la invención como **ANTICUERPOS ANTI-MET**.

Con respecto a las objeciones de claridad, presentamos a consideración de la señora examinadora un nuevo pliego de reivindicaciones donde quedan superadas todas y cada una de las objeciones realizadas. Específicamente, se ha definido el anticuerpo de la reivindicación 1 a 6 CDR específicos. En cuanto al término secuencias de soporte, aclaramos que esta terminología es clara para una persona versada en la materia. Adicionalmente, la descripción muestra ejemplos de secuencias de soporte del subgrupo 1 humano así como secuencias de soporte del subgrupo III de la cadena pesada (ver pág. 60.61 y figuras 5, 6, 13 y 14). En cuanto a las mutaciones, estas han sido definidas en las reivindicación 15. El ácido nucleico de la antigua reivindicación 31 ha sido eliminado. Con relación a la objeción sobre la antigua reivindicación 52 ponemos de presente que en la descripción existe suficiente información se cuanto a las células anfitrionas adecuadas para la invención. No obstante esta aclaración, esta reivindicación ha sido modificada en términos de una *línea celular* por lo que damos la objeción por superada.

En cuanto a la antigua reivindicación 53, ponemos de presente que esta no se refiere a una composición farmacéutica sino a una composición solamente.

Ahora bien, teniendo en cuenta que esta reivindicación (nueva 33) se refiere a al anticuerpo de las reivindicaciones 1-23 el cual ha sido debidamente definido damos por superada la objeción.

Ponemos de presente adicionalmente que definir una composición en términos de elementos específicos y proporciones es una limitación demasiado restrictiva que no permitiría proteger adecuadamente el alcance y concepto inventivo de a invención.

Por otra parte, presentamos un nuevo listado de secuencias donde se han introducido las secuencias SEQ ID NO 197,198,199 y 200 las cuales corresponden a cadena pesada completa, cadena ligera completa, región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera respectivamente. Esta modificación no supone aplicación en la medida que las secuencias se encuentran sustentadas en la figura 13.

El señor examinador establece que las reivindicaciones 35-40, 44 hacen referencia a figuras que no están anexadas a la solicitud. Anexamos junto a este memorial copia de dichas figuras. Deseemos también anexar una nueva versión corregida de la figura 4 ya que existe un error en la publicación PCT. Específicamente, las secuencias para las variantes 75 y 95 están incorrectas como sigue: #75 TYRSYVTSLDY; #95 TYRSYVTALDY. En ambos casos el residuo delineado debe ser S y se ha corregido en la nueva figura 4.

Con relación a la objeción de novedad sobre la antigua reivindicación 38, ponemos de presente que esta ha sido eliminada del nuevo pliego.

En cuanto al nivel inventivo del anticuerpo reivindicado frente al anticuerpo murino anti c-met de D1 deseamos resaltar lo siguiente:

Al anticuerpo de D1 fue utilizado por los inventores de la presente invención como anticuerpo de referencia para demostrar la superioridad del anticuerpo reivindicado. Dicho anticuerpo de referencia presentaba unión al receptor c-met humano demostrado mediante una constante Kd de 8.3 nM. Esto lo puede corroborar la señora examinadora en la página 97 líneas 36 a página 98 línea 1 de la descripción de la presente invención. Para mayor claridad del señor examinador y nuestra, nos estamos refiriendo a las páginas de la publicación PCT.

De manera sorprendente, los inventores lograron sintetizar anticuerpos que tenían una afinidad por el receptor c-met casi tres veces mayor que la afinidad observada en el anticuerpo murino 5D5. Específicamente, las variantes 5D5 # 92, 78, 75 y 95 presentaron valores Kd de 1.05 nM, 0.623 nM, 1.9 nM y 2.53 Nm respectivamente lo cual nos indica que las afinidades de los anticuerpos desarrollados por los inventores están el orden de 7.9, 13.3, 4.4 y 3.3 mayor que aquella encontrada para el anticuerpo murino 5D5 de D1.

Para claridad del señor examinador, vale la pena también resaltar que estos valores de afinidad se encuentran descritos en la figura 4 de la presente invención. Entonces, es justamente esta actividad sorprendente la que permite obtener un avance en el estado de la técnica por lo que tal actividad no puede ser menospreciada a la hora de evaluar el salto técnico de la invención y por ende su actividad inventiva.

No obstante lo anterior, los inventores escogieron para experimentos adicionales la variante # 78 del anticuerpo el cual presenta la secuencia SEQ ID NO: 159 reivindicada el cual demostró inhibir la proliferación celular dependiente del receptor c-met con un IC_{50} correspondiente a aproximadamente la mitad del IC_{50} observado con el anticuerpo de comparación que en este caso fue un anticuerpo quimérico que comprende una región Fab del anticuerpo de murina 5D5. Esto se puede observar claramente en las páginas 99 líneas 28 a 36 y figura 10 de la presente solicitud de patente.

Así, los anticuerpos desarrollados por los inventores de la presente invención no solamente fueron capaces de unirse al receptor c-met humano sino que también demostraron una afinidad y especificidad mucho mayor que la demostrada para el anticuerpo 5D5 de D1. Adicionalmente, como indicio adicional de nivel inventivo, los anticuerpos de la invención fueron capaces de inhibir la proliferación celular dependiente del receptor c-met de una manera más sorprendente que el anticuerpo murino 5D5 de referencia.

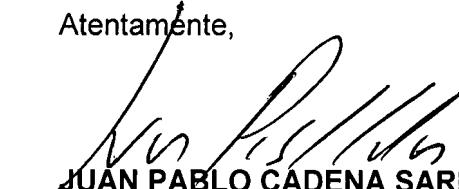
En este orden de ideas, el desarrollo de los anticuerpos reivindicados no era solamente una actividad rutinaria para una persona versada en la materia rutina. Específicamente cuando los HVRs del anticuerpo de referencia 5D5 (D1) fueron injertados en los marcos aceptores humanos, el anticuerpo resultante no se unió al receptor c-met. Para solucionar esto, se hizo necesario hacer una mutación para restaurar la unión total al receptor c-met, resultando en un anticuerpo que tenía una afinidad similar de unión a c-MET como se observaba con el anticuerpo 5D5. Para ello, se llevó a cabo un procedimiento conocido como *maduración de afinidad* con el fin de aumentar la afinidad de unión del anticuerpo al receptor c-met de tal manera que se obtuviera una respuesta en la escala de 7,9, 13,3, 4,4 y 3,3 veces mayor que la afinidad del anticuerpo monovalente murino 5D5. Así, el proceso de realizar una mutación particular, para producir un anticuerpo capaz de unirse al receptor c-met así como la ubicación y la naturaleza de la mutación (R94S) no habría sido evidente para un experto en la técnica en vista del documento D1 y menos aún en vista de los resultados sorprendentes de afinidad obtenidos con el anticuerpo reivindicado.

Finalmente, deseamos presentar una solicitud divisional dirigida a la materia inicialmente reivindicada.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la decisión 486.

Del Señor Director

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.SJ.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado anti-c-met anticuerpo que comprende:

(I) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A17, en donde A1-A17 es KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 1)

(II) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en donde B1-B7 es WASTRES (SEQ ID NO: 2)

(III) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en donde C1-C9 es QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 3)

(IV) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en donde D1-D10 es GYTFTSYWLH (SEQ ID NO: 4)

(V) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en donde E1-E18 es GMIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO: 5), y

(VI) HVR-H3 que comprende la secuencia TYRSYVTPLDY (SEQ ID NO: 159), SYRSYVTPLDY (SEQ ID NO: 145), TYSSYVTPLDY (SEQ ID NO: 162), o TYSSYVTALDY (SEQ ID NO: 163)

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, caracterizado porque HVR-H3 es TYRSYVTPLDY (SEQ ID NO: 159).

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2 que comprende una secuencia de soporte humano κ de subgrupo I consensual.

4. El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2 que comprende una secuencia de soporte humano de subgrupo III consensual de cadena pesada.

5. El anticuerpo de la reivindicación 4 en donde la secuencia de soporte comprende una sustitución en la posición 71, 73 y / o 78.

6. El anticuerpo de la reivindicación 5 en donde dicha sustitución es R71A, N73T y / o N78A.

7. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 199.

8. El anticuerpo de la reivindicación 7 en donde la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 194 y / o 195.

9. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 200.

10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que la cadena ligera comprende además la SEQ ID NO: 186.

11. Un anticuerpo aislado anti c-met que comprende el dominio variable de cadena pesada de la reivindicación 8 o la reivindicación 9 y el dominio variable de cadena ligera de la reivindicación 9 o reivindicación 10.
12. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es monovalente.
13. El anticuerpo de la reivindicación 12 que comprende además una región Fc.
14. El anticuerpo de la reivindicación 13, en donde la región Fc comprende un primer y un segundo polipéptido, en donde el primer y segundo polipéptido cada uno comprende una o más mutaciones con respecto al tipo salvaje Fc humano, en donde el primer polipéptido comprende mutaciones T366S, L368A y Y407V y el segundo polipéptido comprende mutaciones T366W.
15. El anticuerpo de la reivindicación 13, en donde el primer polipéptido comprende la secuencia SEQ ID NO: 195 y el segundo polipéptido comprende la secuencia SEQ ID NO: 196.
16. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 en donde el anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 199 y un segundo polipéptido que comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 200.
17. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 en donde el anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 197 y un segundo polipéptido que comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 198.
18. El anticuerpo de la reivindicación 16 o reivindicación 17 que comprende además un tercer polipéptido que comprende una secuencia Fc que comprende la SEQ ID NO: 196.
19. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, el cual es un anticuerpo monoclonal.
20. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, el cual es un fragmento de anticuerpo que se une a c-met.
21. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente en el que el anticuerpo es una IgG1.
22. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente el cual es humanizado.
23. Una línea celular que produce el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
24. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.
25. La composición de la reivindicación 24 que comprende además un portador.
26. Un método para producir un anticuerpo, el método que comprende cultivar la línea celular de la reivindicación 23 de modo que el anticuerpo se produzca.

27. El método de la reivindicación 26, que comprende además la recuperación del anticuerpo de la línea celular.

28. El método de la reivindicación 26, que comprende además la combinación del anticuerpo recuperado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o vehículo para preparar una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo.

FIG._13

5D5.v2 Light Chain

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 179)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 180)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 181)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 182)
HVR1-LC: KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 183)
HVR2-LC: WASTRES (SEQ ID NO: 184)
HVR3-LC: QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 185)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSLTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 186)

5D5.v2 Heavy chain

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 187)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 188)
FR3-HC: RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 189)
FR4-HC: WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 190)
HVR1-HC: GYTFTSYWLH (SEQ ID NO: 191)
HVR2-HC: GMIDPSNSDTRFNPFPKD (SEQ ID NO: 192)
HVR3-HC: ATYRSYVTPLDY (SEQ ID NO: 193)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 194)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 195)

WO 2006/015371

16/17

PCT/US2005/02626

FIG._14

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 196)

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
SEQUENCE LISTING

<110> DENNIS, MARK S.
BILLECI, KAREN
YOUNG, JUDY
ZHENG, ZHONG

<120> HUMANIZED ANTI-CMET ANTAGONISTS

<130> P2138R1 PCT

<140> PCT/US2005/027626
<141> 2005-08-04

<150> US 60/598,991
<151> 2004-08-05

<160> 199

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 1
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 2
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 3

12

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 4
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
1 5 10

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 5
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
1 5 10 15

Lys Asp

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Any amino acid except Arg

<400> 6
Xaa Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
peptide

<400> 7

Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 8

Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

Glu Lys Val Thr Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Thr Ser Val Lys Ala Asp Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 10
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Asn Val Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 11
 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 Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg 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

15

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 12
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 13
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

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

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

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr 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 Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

Ala Arg Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Leu Asp Ala Gln Thr
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Leu Thr Glu Lys Arg Lys Lys Arg Ser
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Met
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Asn Val Arg Cys Leu Gln His Phe
1 5

<210> 19
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Thr Ile
35 40 45

Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
50 55 60

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 20
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 20
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

<210> 21
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 22
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 22
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75

<210> 23
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 23
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Trp Ile
20 25 30

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

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
50 55 60

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 24
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 24
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 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

<210> 25
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

24

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
polypeptide

<400> 25

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 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 26

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<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 Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75

<210> 27

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 27

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

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

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

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

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 28
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

<210> 29
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

23

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 30

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75

<210> 31

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

GENENLAW-400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
 35 40 45
 Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 50 55 60
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 32
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Ser

<210> 33
 <211> 80
 <212> PRT

25

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 34

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 34

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

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

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

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 35

<211> 81

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

<210> 36

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 37

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75

<210> 38
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 38
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 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 39
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

GENENLAW-400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 39
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 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
20 25 30

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
50 55 60

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 40
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 40
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 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
50 55 60

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 41
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Página 18

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
polypeptide

<400> 41

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 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp
50 55 60

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 43

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 44
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 45
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 46
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 46
 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
 20

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 47
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

31

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
polypeptide

<400> 48

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 49

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 50

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Ala or Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Thr or Asn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Ala or Leu

<400> 50

Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 51

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

32

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 51

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 52

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 52

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 53

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 54

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 54

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

33

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
20 25 30

<210> 55
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 55
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
20 25 30

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 56
Trp Ala Ser Thr Pro Ala Ser
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 57
Trp Ala Ser Ile Arg Asp Arg
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 58
Met Pro Asn Thr Arg Asp Ser
1 5

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 59
 Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ile
 1 5

<210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 60
 Trp Ala Gly Ile Arg Glu Met
 1 5

<210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 61
 Leu Ala Ser Asn Arg Glu Gly
 1 5

<210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 62
 Trp Thr Gly Asn Arg Glu Met
 1 5

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

35

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 63
Trp Ala Arg Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 64
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 65
Trp Ala Ser Thr Pro Glu Ser
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Any amino acid

<400> 66
Trp Ala Ser Xaa Arg Glu Ser
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 67
Trp Ala Ser Asn Ile Thr Ser
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 68
Trp Ala Asn Phe Arg Val Ser
1 5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 69
Trp Thr Ser Asn Arg Val Ser
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 70
Leu Gly Gly Thr Arg Val Ser
1 5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 71
Leu Ala Thr Thr Arg Val Ser
1 5

38

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 72
Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 73
Trp Ala Ser Thr Leu Val Ser
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 74
Trp Ala Ser Thr Gly Val Gly
1 5

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 75
Trp Ser Ser Thr Arg Val Ser
1 5

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

37

GENENLAW-400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 76

Gly Tyr Asn Phe Ile Gly Phe Trp Met His
1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 77

Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Phe Trp Leu His
1 5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 78

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Trp Leu His
1 5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 79

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp Leu His
1 5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 80

Gly Tyr Pro Phe Thr Thr Arg Trp Leu His
1 5 10

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 81
 Gly Tyr Leu Phe Thr Ser Ser Trp Leu His
 1 5 10

<210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 82
 Gly Tyr Asn Phe Ser Ser Ser Trp Leu His
 1 5 10

<210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 83
 Gly Tyr Pro Phe Thr Lys Ser Trp Leu His
 1 5 10

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 84
 Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Ser Trp Val His
 1 5 10

<210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 85

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Trp Leu His
1 5 10

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 86

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp Leu His
1 5 10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 87

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Leu His
1 5 10

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 88

Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Thr Trp Leu His
1 5 10

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 89

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Val Trp Leu His
1 5 10

41

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 90
Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Val Trp Leu His
1 5 10

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 91
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Val Trp Leu His
1 5 10

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 92
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Val Trp Leu His
1 5 10

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 93
Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
1 5 10

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

42

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 94

Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr Trp Leu His
1 5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 95

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
1 5 10

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 96

Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Tyr Trp Leu His
1 5 10

<210> 97

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 97

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Ile Arg Phe Asn Pro Asp Phe
1 5 10 15

Glu Asp

<210> 98

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

43

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 98
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Thr Lys Phe
1 5 10 15

Glu Asp

<210> 99
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 99
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Lys Phe
1 5 10 15

His Asp

<210> 100
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 100
Gly Met Ile Asp Pro Ser Tyr Ser Ile Thr Arg Phe Asn Pro Lys Phe
1 5 10 15

Lys Tyr

<210> 101
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 101
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Lys Phe
1 5 10 15

Asn Tyr

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 102
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 102
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Lys Phe
 1 5 10 15

Asn Asp

<210> 103
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 103
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Lys Phe
 1 5 10 15

Asn Glu

<210> 104
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 104
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
 1 5 10 15

Asp Asp

<210> 105
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

45

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 105
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
1 5 10 15

Glu Asp

<210> 106
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 106
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Gln Asn Phe
1 5 10 15

Glu Asp

<210> 107
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 107
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
1 5 10 15

Glu His

<210> 108
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 108
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
1 5 10 15

Lys Glu

46

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 109
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 109
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Leu
1 5 10 15

Gln Asp

<210> 110
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 110
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Ser Leu
1 5 10 15

Glu Asp

<210> 111
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 111
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Thr Phe
1 5 10 15

Glu Asp

<210> 112
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

47

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 112
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Val Leu
1 5 10 15

Lys Asp

<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 113
Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 114
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 114
Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 115
Ser Tyr Arg Ser Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 116
Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

4A

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 117
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 117
Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Gln
1 5 10

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 118
Ser Tyr Arg Ser Tyr Phe Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 119
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 119
Ser Tyr Ser Ser Tyr Met Arg Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 120
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 120
Ser Tyr Ser Ser Tyr Thr Arg Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

GENENLAW-400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 121
Ser Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 122
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 122
Thr Tyr Gly Ser Tyr Glu Lys Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 123
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 123
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Lys Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 124
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Arg Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 125
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 125
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

50

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 126
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 126
Thr Tyr His Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 127
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 127
Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 128
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 128
Thr Tyr Arg Ser Tyr Lys Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 129
Thr Tyr Arg Ser Tyr Phe Thr Pro Leu Tyr Tyr
1 5 10

<210> 130
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

51

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 130
Thr Tyr Arg Gly Tyr Glu Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 131
Thr Tyr Arg Ser Tyr Phe Val Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 132
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Lys Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 133
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 133
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Arg Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 134
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 134
Thr Tyr Ser Ser Tyr Met Arg Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

n

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 135
Thr Tyr Ser Ser Tyr Met Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 136
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 136
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 137
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 137
Thr Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 138
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 138
Thr Tyr Thr Ser Tyr Arg Leu Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 139
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

53

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 139

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
1 5 10

<210> 141

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 141

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
1 5 10 15

Lys Asp

<210> 142

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 142

Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 143

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

54

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 143
Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 144
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 144
Ser Tyr Arg Ser Tyr Arg Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 145
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 145
Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 146
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 146
Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Val Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 147
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 147
Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Val Pro Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 148

58

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 148
Ser Tyr Ser Ser Tyr Val Lys Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 149
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 149
Ser Tyr Ser Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 150
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 150
Thr Tyr Ala Ser Tyr Ala Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 151
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 151
Thr Tyr Ala Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 152
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

56

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 152
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 153
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 153
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp His
1 5 10

<210> 154
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 154
Thr Tyr Gly Ser Tyr Met Val Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 155
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 155
Thr Tyr His Ser Tyr Leu Val Pro Leu Asn Tyr
1 5 10

<210> 156
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 156
Thr Tyr Lys Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 157

57

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 157
 Thr Tyr Arg Ser Tyr Arg Ser Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 158
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 158
 Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Phe
 1 5 10

<210> 159
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 159
 Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 160
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 160
 Thr Tyr Ser Ser Tyr Trp Ile Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 161
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

58

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 161
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Arg Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 162
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 163
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 163
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 164
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 164
Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
1 5 10

<210> 165
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 165
Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val
1 5 10

<210> 166

59

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 166

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His Trp Val
1 5 10

<210> 167

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 167

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Leu His Trp Val
1 5 10

<210> 168

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 168

Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro
1 5 10 15

Asn Phe Lys Asp Arg Phe
20

<210> 169

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 169

Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Thr
1 5 10 15

Lys Phe Glu Asp Arg Phe
20

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<210> 170
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 170
Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro
1 5 10 15

Asn Phe Glu Asp Arg Phe
20

<210> 171
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 171
Cys Ala Arg Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 172
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 172
Cys Ala Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 173
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 173
Cys Ala Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 174
<211> 15
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 174

Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 175

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 175

Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 176

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 176

Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 177

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 177

Cys Ala Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 178

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 178

62

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
Cys Ala Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 179
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 179
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
20

<210> 180
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 180
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 181
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 181
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 182
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

63

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 182
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 183
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial sequence: Synthetic peptide

<400> 183
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 184
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial sequence: Synthetic peptide

<400> 184
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 185
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial sequence: Synthetic peptide

<400> 185
Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 186
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial sequence: Synthetic polypeptide

<400> 186
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

64

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 187
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 187
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 188
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 188
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 189
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

64

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 189

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 190

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 190

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 191

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 191

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
1 5 10

<210> 192

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 192

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
1 5 10 15

Lys Asp

<210> 193

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 193

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 194

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 194

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
100 105

<210> 195

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 195

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
Página 56

67

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 196
<211> 222
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 196
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 197
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 197

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 Página 59

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

- <210> 198
- <211> 220
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Description of Artificial sequence: Synthetic polypeptide

21

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<400> 198

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 199

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

72

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 199

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 200

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 200

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

73

GENENLAW-_400622-v1-P2138R1_AU_replacement_Seq_Listing

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

74



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

AS. 121.085

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

GENENTECH, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro

Número _____

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

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

3. Datos del apoderado:

CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

80.410.337

57492

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

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

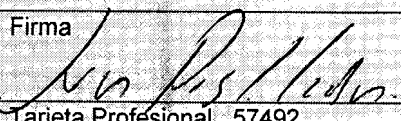
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

75

4. Datos del trámite		
CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 07 012.528	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

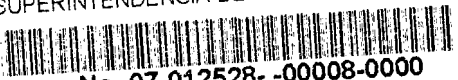
5. Anexos
Comprobante de pago No. _____ Fecha: _____

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

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

121085 76

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
NIT : 800.176.089-2					
- / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0047089	
				Bogotá D.C., Mayo 14 de 2012 - 08:26:22	
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.				NI 860.047.372	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	445891563	11/05/2012	10.090.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00	
				\$590.000.00	
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 07-012528- -00008-0000 Fecha: 2012-05-31 16:11:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act 523 RESPUESTA Folios: 326					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Mayo 14 de 2012 - 08:26:25					

12108577

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

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0053994
		Bogotá D.C., Mayo 29 de 2012 - 16:14:13

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

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	445891622	29/05/2012	4.230.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
42 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	1.260.000.00
			\$1.260.000.00
=====			

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

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-012528- -00008-0000
Fecha: 2012-05-31 16:11:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 523 RESPUESTA Folios: 326

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

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

Mayo 29 de 2012 - 16:14:14

78
78

Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

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

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

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

Otorgado y firmado en

hoy de de 200

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.
1 DNA Way

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

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

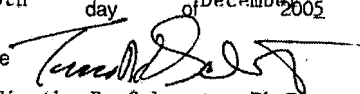
To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting;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

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

South San Francisco, California

Granted and signed in **USA**

this 6th day of December 2005

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

AUTHORIZATION

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

August 27, 2002

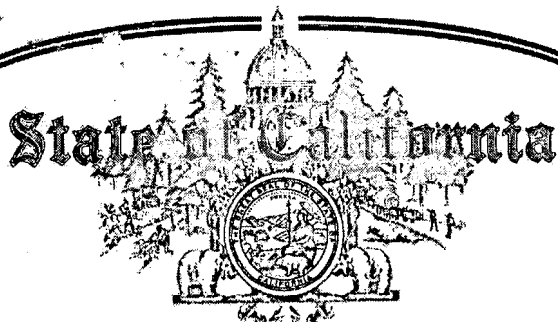
Dated

Sean Johnston

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

77
79

15:77:08



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

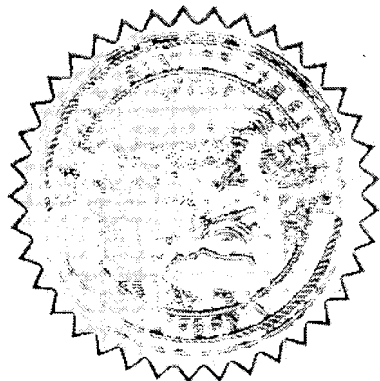
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

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

10. Signature



Bruce M. Sherman

Secretary of State

[Signature]



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

} ss.

On December 6, 2005

before me,

Aida Mielat Guian

Date

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

personally appeared

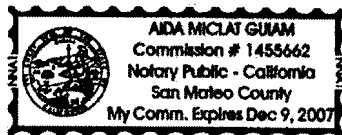
Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

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



WITNESS my hand and official seal.

Aida Mielat Guian
Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____

Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s): _____

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney-in-Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

278
88

93 33

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

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

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

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

CERTIFICADO

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

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado

RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

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

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

☐ a quien conozco personalmente

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

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

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

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

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

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

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

Nombre del firmante: _____

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

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí

29
81

AUTORIZACION

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

27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual

Genentech, Inc.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

5. at Dover, Delaware

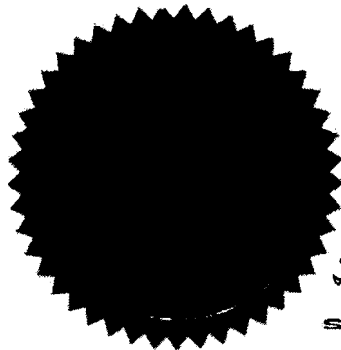
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005.

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State

Delaware

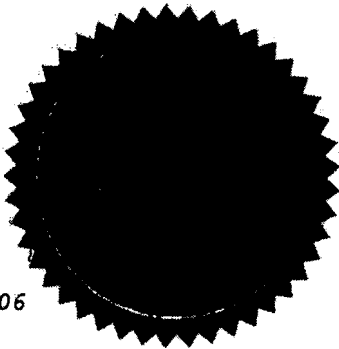
PAGE 1

The First State

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

2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION:

GENENTECH, INC.

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

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

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

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

ARTICLE 3

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

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

81
83

ARTICLE 4

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

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

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

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

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

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

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

- (i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;
- (ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;
- (iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;
- (iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;
- (v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;
- (vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;
- (vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and
- (viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

84

ARTICLE 5

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

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

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

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

ARTICLE 6

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

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

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

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

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

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

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

83
85

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

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

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

ARTICLE 7

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

ARTICLE 8

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

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

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

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

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

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

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

84
86

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

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

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

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

ARTICLE 9

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

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

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

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

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

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

88
8A

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

86

88

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

APOSTILLA

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

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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

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

FECHA: 05 - 24 - 05

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

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

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

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

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

ARTICULO 3

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

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones

preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro de las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

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

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

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

88

90

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTICULO 5

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

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

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

o

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

ARTICULO 6

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

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

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

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

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

permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión con cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, *Sección 203 de la Ley de Delaware*. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.

ARTICULO 8

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

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

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

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

En el evento que Roche adquiriera conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho

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

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

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

SECCION 8.05. *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (como se

97
93

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

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "*Corporación*" y "*Roche*" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

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

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

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

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

92
94

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría

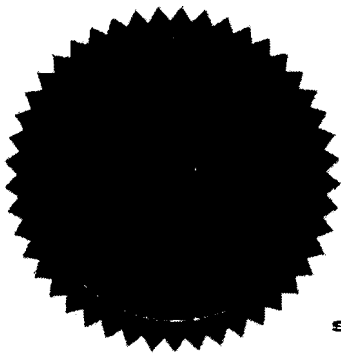
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

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



Harriet Smith Windsor
Secretary of State

Delaware

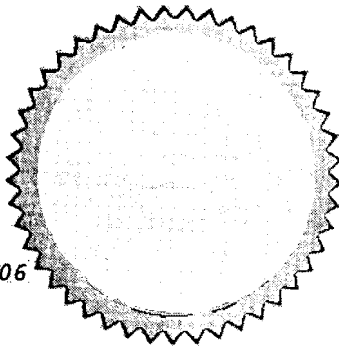
PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

94
96

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

APOSTILLA

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

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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

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

FECHA: 05 - 24 - 05

98
92

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

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

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

96
98

10. 11. 2005
3/4

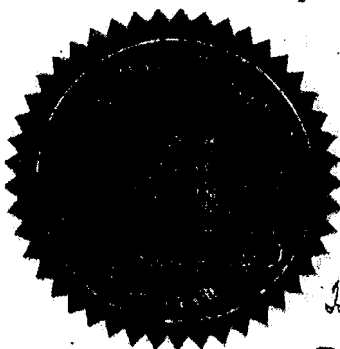
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

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



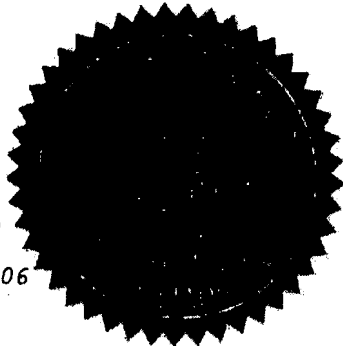
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

Delaware

PAGE 1

The First State

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



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

92
99

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

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

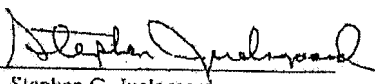
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares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

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

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

APOSTILLA

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

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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

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

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

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

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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

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

99
101

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

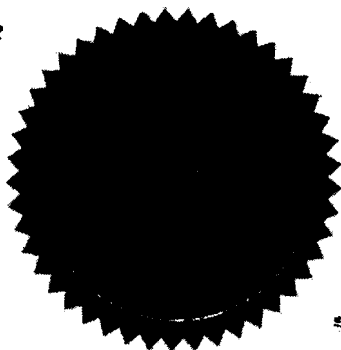
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

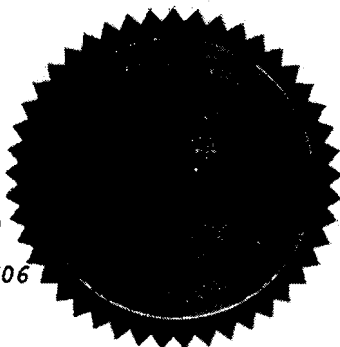
~~100~~
102

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF
DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT
COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED
IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05
O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 62:05 PM 05/10/2001
G10224224 - 2112549

S ///STATE/OF/DELAWARE/// V
T ///SECRETARY/OF/STATE/// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS/// I
M FILED/05/05/01/05/10/2001/ D
P ///G10224224///Z112549///
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

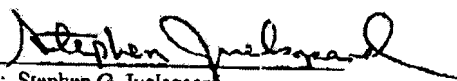
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares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

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

101
103

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

APOSTILLA

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

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

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

102
104

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

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

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

ANTAGONISTAS HUMANIZADOS ANTI-CMET

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud es una solicitud no provisional, registrada bajo el 37 CFR 1.53(b)(I), que reivindica la prioridad bajo el 35 USC 119(e) de la solicitud provisional número 60/598,991 presentada el 5 de agosto de 2004, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad, por referencia.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona en forma general con los campos de la biología molecular y la regulación del factor de crecimiento. Más específicamente, la invención se relaciona con moduladores de la vía de señalización del FCH/c-met y usos de los citados moduladores.

ANTECEDENTES

El FCH (factor de crecimiento hepatocítico humano) es un factor pleotrófico derivado del mesénquima con actividades mitogénicas, motogénicas y morfogénicas en muchos tipos diferentes de células. Los efectos del FCH se median a través de una tirosina cinasa específica y con frecuencia se observa una expresión c-met y el FCH aberrante y c-met en una variedad de tumores. Consultar por ejemplo, Maulik y colaboradores, Cytokine & Growth Factor Reviews (2002), 13:41-59; Danilkovitch-Miagkova & Zbar, J. Clin. Invest. (2002), 109(7):863-867. La regulación de la vía de señalización FCH/c-Met se encuentra implicada en la progresión de un tumor y la metástasis. Consultar por ejemplo, Trusolino Comoglio, Nature Rev. (2002), 2:289-300).

El FCH fija el dominio extracelular del receptor Met de tirosina cinasa (RTC) y regula diversos procesos biológicos como la dispersión, proliferación y supervivencia de las células. La señalización del FCH-Met es esencial para el desarrollo embrionario normal, especialmente en la migración de células progenitoras de músculo y en el desarrollo del hígado y del sistema nervioso (Bladt y colaboradores, 1995; Hamanoue y colaboradores, 1996; Maina y colaboradores, 1996; Schmidt y colaboradores, 1995; Uehara y colaboradores, 1995). Los fenotipos del desarrollo de ratones con inactivación de los genes

específicos Met y FCH son muy similares y sugieren que el FCH es el ligando cognado para el receptor Met (Schmidt y colaboradores, 1995; Uehara y colaboradores, 1995). Igualmente, el FCH-Met juega un papel en la regeneración hepática, en la angiogénesis y en la cicatrización de heridas (Bussolino y colaboradores, 1992; Matsumoto y Nakamura, 1993; Nusrat y colaboradores, 1994). El receptor Met precursor sufre una segmentación proteolítica en una subunidad extracelular α y una extensión de la subunidad de la membrana β unidas mediante enlaces de bisulfito (Tempest y colaboradores, 1988). La subunidad β contiene el dominio citoplásmico cinasa y alberga un sitio de anclaje de múltiples substratos en el terminal C donde las proteínas adaptadoras se unen e inician la señalización (Bardelli y colaboradores, 1997; Nguyen y colaboradores, 1997; Pelicci y colaboradores, 1995; Ponzetto y colaboradores, 1994; Weidner y colaboradores, 1996). En el momento de la fijación del FCH, la activación de la Met genera una fosforilación de la tirosina y la señalización descendiente por medio de y mediada por Gabl y Grb2/Sos PI3-cinasa y la activación Ras/MAPK respectivamente, lo cual produce la motilidad y la proliferación celular (Furge y colaboradores, 2000; Hartmann y colaboradores, 1994; Ponzetto y colaboradores, 1996; Royal y Park, 1995).

Se mostró que la Met es un transformador en una estirpe celular de osteosarcoma tratado con cancerígenos (Cooper y colaboradores, 1984; Park y colaboradores, 1986). Se ha observado una hiperexpresión de la Met o una amplificación del gen en una variedad de cánceres humanos. Por ejemplo, la proteína Met está hiperexpresada por lo menos cinco veces en los cánceres colorrectales y se ha reportado que amplifica el gen en la metástasis en el hígado. (Di Renzo y colaboradores, 1995; Liu y colaboradores, 1992). Igualmente se reporta que se observó una hiperexpresión de la proteína Met en el carcinoma escamoso oral, el carcinoma hepatocelular, el carcinoma renal, el cáncer de mama y el cáncer de pulmón (Jin y colaboradores, 1997; Morello y colaboradores, 2001; Natali y colaboradores, 1996; Olivero y colaboradores, 1996; Suzuki y colaboradores, 1994). Adicionalmente, se ha observado la hiperexpresión del mRNA en el carcinoma hepatocelular, el carcinoma gástrico y el carcinoma colorrectal (Boix y colaboradores, 1994; Kuniyasu y colaboradores, 1993; Liu y colaboradores, 1992).

Se han encontrado una serie de mutaciones en el dominio de la cinasa de la Met en el carcinoma renal papilar que produce una activación del receptor constitutivo (Olivero y colaboradores, 1999; Schmidt y colaboradores, 1997;

135
107

Schmidt y colaboradores, 1999). Estas mutaciones de activación confieren una fosforilación tirosina constitutiva de la Met y resultan en una activación MAPK, en la formación del objetivo principal y oncogenia (Jeffers y colaboradores, 1997). Adicionalmente, estas mutaciones mejoran la motilidad celular y la invasión (Giordano y colaboradores, 2000; Lorenzato y colaboradores, 2002). La activación dependiente del HGF en células transformadas media una mayor motilidad, dispersión y migración de las células lo cual finalmente produce el crecimiento de un tumor invasivo y la metástasis (Jeffers y colaboradores, 1996; Meiners y colaboradores, 1998).

Se ha visto que la Met interactúa con otras proteínas que estimulan la activación del receptor, la transformación y la invasión. En las células neoplásicas, se ha reportado que la Met interactúa con la integrina $\alpha 6 \beta 4$, un aceptor para los componentes de la matriz extracelular (ECM) tales como las lamininas, para estimular el crecimiento invasivo dependiente del FCH (Trusolino y colaboradores, 2001). Adicionalmente, se ha visto que el dominio extracelular de la Met interactúa con un miembro de la familia de las semaforinas, plexina B1 y mejora el crecimiento invasivo (Giordano y colaboradores, 2002). Además, CD44v6, que se ha visto implicado en la oncogenia y la metástasis, está reportado en la formación de un complejo con Met y FCH y resulta en la activación del receptor de la Met (Orian-Rousseau y colaboradores, 2002).

La Met es un miembro de la subfamilia de RTKs que incluyen Ron y Sea (Maulik y colaboradores, 2002). La predicción de la estructura del dominio extracelular de la Met sugiere una homología compartida con las semaforinas y plexinas. El terminal N de la Met contiene un dominio Sema de aproximadamente 500 aminoácidos que se conserva en todas las semaforinas y plexinas. Las semaforinas y plexinas pertenecen a una familia grande de proteínas secretadas y fijadas en la membrana descritas inicialmente por su papel en el desarrollo neural (Van Vactor y Lorenz, 1999). Sin embargo, más recientemente la hiperexpresión de la semaforina se ha relacionado con una invasión tumoral y con metástasis. Un dominio PSI rico en cisteína (al cual también se hace referencia como un dominio de Secuencia Relacionada con Met) que se encuentra en las plexinas, en las semaforinas y en las integrinas se encuentra adyacente al dominio Sema seguido por cuatro repeticiones IPT que son regiones similares a la inmunoglobulina presentes en las plexinas y los factores de transcripción. Un estudio reciente sugiere que el dominio Sema de la Met es suficiente para la fijación del FCH y de la heparina (Gherardi y colaboradores, 2003). Adicionalmente, Kong-Beltran y

colaboradores (Cancer Cell (2004), 6:61- 73) han reportado que el dominio Sema de la Met es necesario para la dimerización y la activación del receptor.

Se han reportado numerosas moléculas dirigidas hacia las vías FCH/c-met. Estas moléculas incluyen anticuerpos como aquellos descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,686,292. También se ha visto que una porción del dominio extracelular de la c-met puede producir efectos antagonistas contra la vía FCH/c-met. En vista del papel tan importante que juega esta vía en la etiología de varias condiciones patológicas, queda claro sin embargo que se continúan necesitando agentes con atributos clínicos que sean óptimos para el desarrollo como agentes terapéuticos. La invención descrita en la presente satisface esta necesidad y dispone otros beneficios.

Todas las referencias citadas en la presente, incluyendo las solicitudes de patente y las publicaciones, se incorporan en su totalidad por referencia.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

La invención se basa en parte en la identificación de una variedad de antagonistas de la vía biológica FCH/c- Met que es un proceso biológico/celular que presenta un objetivo terapéutico tanto importante como ventajoso. La invención dispone composiciones y métodos que se basan en la interferencia de la activación del FCH/c-met, incluyendo pero no limitado a la interferencia con la fijación del FCH a la porción extracelular de la c-met y la multimerización del aceptor. Los antagonistas de la invención, como se describe en la presente, disponen agentes terapéuticos y de diagnóstico importantes para el uso cuando se busca fijar como objetivo las condiciones patológicas asociadas a una señalización anormal o indeseada de la vía FCH/c-met. Por lo tanto, la invención dispone unos métodos, unas composiciones, unos estuches y unos artículos de manufactura relacionados con la modulación de la vía FCH/c-met, incluyendo la modulación de la fijación del ligando c-met, la dimerización de la c-met, la activación y otras actividades biológicas/fisiológicas asociadas con la señalización del FCH/c-met.

En un aspecto, la invención dispone agentes terapéuticos anti-FCH/c-met apropiados para el uso terapéutico y capaces de efectuar diversos grados de variación de la vía de señalización del FCH/c-met. Por ejemplo, en una incorporación, la invención dispone un anticuerpo humanizado anti-c-met donde la afinidad del anticuerpo monovalente a la c-met humana (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab a la c-met humana) es sustancialmente

185
109

igual a la afinidad de un anticuerpo monovalente murino (por ejemplo, afinidad del anticuerpo murino como un fragmento Fab a c-met humana) que comprende, consiste en o consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena liviana y pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No:9 y 10). En otra incorporación, la invención dispone un anticuerpo humanizado anti-c-met donde la afinidad del anticuerpo monovalente a la c-met humana (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab a la c-met humana) es menor, por ejemplo por lo menos 3, 5, 7 o 10 veces menor, que la afinidad de un anticuerpo monovalente murino (por ejemplo, afinidad del anticuerpo murino como un fragmento Fab a la c-met humana) que comprende, consiste en o consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena liviana y pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10). En otra incorporación, la invención dispone un anticuerpo humanizado anti-c-met donde la afinidad del anticuerpo monovalente a la c-met humana (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab a la c- met humana) es mayor, por ejemplo por lo menos 3, 5, 7, 10 o 13 veces mayor, que la afinidad de un anticuerpo monovalente murino (por ejemplo, afinidad del anticuerpo murino como un fragmento Fab a la c-met humana) que comprende, consiste en o consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena liviana y pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10). En una incorporación, la afinidad del anticuerpo monovalente murino a la c-met humana es sustancialmente igual a la afinidad de unión de un fragmento Fab que comprende secuencias de dominio variable de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridomas depositadas bajo la Colección Americana de Cultivos de Tipo, Número de Acceso ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). Como se encuentra bien establecido en el arte, la afinidad de unión de un ligando a su aceptor se puede determinar mediante el uso de una variedad de análisis y se puede expresar en términos de una variedad de valores cuantitativos. Por lo tanto, en una incorporación, la afinidad de unión se expresa como valores Kd y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con unos efectos de afinidad minimizados). Generalmente y preferiblemente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, sin importar si se encuentra en un entorno libre de células o en un entorno asociado a células. Como se describe en mayor detalle en la presente, la diferencia de la multiplicación de la afinidad de unión se puede cuantificar en términos de la proporción del valor de afinidad de la unión de un anticuerpo humanizado monovalente (por ejemplo, en forma Fab) y el valor de afinidad de la unión de un

anticuerpo monovalente de referencia o de comparación (por ejemplo, in forma Fab) (por ejemplo, un anticuerpo murino que tiene unas secuencias de región hipervariable de donante), donde los valores de afinidad de unión se determinan bajo unas condiciones de análisis similares. Por lo tanto, en una incorporación, la diferencia de la multiplicación en la afinidad de unión se determina como la proporción de los valores de Kd del anticuerpo humanizado en la forma Fab y el citado anticuerpo Fab de referencia/comparación. Por ejemplo, en una incorporación, si un anticuerpo de la invención (A) tiene una afinidad que es "3 veces menor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (M), entonces si el valor Kd para A es 3x, el valor Kd de M sería 1x y la proporción de Kd de A a Kd de M sería 3: 1. Inversamente, en una incorporación, si un anticuerpo de la invención (C) tiene una afinidad que es "3 veces mayor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (R), entonces si el valor Kd para C es 1x, el valor Kd de R sería 3x y la proporción de Kd de C a Kd de R sería 1:3. Se puede emplear cualquier número de análisis conocidos en el arte, incluyendo aquellos descritos en la presente, para obtener las mediciones de la afinidad de unión, incluyendo, por ejemplo, Biacore, radioinmunoanálisis (RIA) y ELISA.

En un aspecto, un antagonista FCH/c-met de la invención abarca un anticuerpo anti-c-met el cual comprende:

(a) por lo menos uno, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de regiones hipervariables (HVR) seleccionadas entre el grupo conformado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A17, donde A1-A17 es KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID No: 1)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B 1-B7, donde B1-B7 es WASTRES (SEQ ID No:2)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QQYYAYPWT (SEQ ID No:3)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWLH (SEQ ID No:4)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID No:5) y

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F11, donde F1-F11 es XYGSYVSPLDY (SEQ ID NO:6) y X no es R;

y (b) por lo menos una variante HVR, donde la secuencia de una variante HVR comprende la modificación de por lo menos un residuo de la secuencia representada en la SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En una incorporación, la HVR-L1

109
111

de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEQ ID No: 1. En una incorporación, la HVR-L2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEQ ID No:2. En una incorporación, la HVR-L3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEQ ID No:3. En una incorporación, la HVR-H1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEQ ID No:4. En una incorporación, la HVR-H2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEQ ID No:5. En una incorporación, la HVR-H3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEQ ID No:6. En una incorporación, la HVR-H3 comprende TYGSYVSPLDY (SEQ ID No: 7). En una incorporación, la HVR-H3 comprende SYGSYVSPLDY (SEQ ID No: 8). En una incorporación, un anticuerpo de la invención que comprende estas secuencias (combinadas como se describe en la presente) es humanizado o humano.

En un aspecto, la invención dispone un anticuerpo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs, donde cada HVR comprende, consiste en o esencialmente consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo conformado por SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y donde SEQ ID No:1 corresponde a una HVR-L1, SEQ ID No:2 corresponde a una HVR-L2, SEQ ID No:3 corresponde a una HVR-L3, SEQ ID No:4 corresponde a una HVR-H1, SEQ ID No:5 corresponde a una HVR-H2 y SEQ ID Nos: 6, 7 u 8 corresponden a una HVR-H3. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la cual, cada una en orden, comprende SEQ ID No:1, 2, 3, 4, 5 y 7. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en el cual, cada una en orden, comprende SEQ ID No:1, 2, 3, 4, 5 y 8.

Las variantes HVRs en un anticuerpo de la invención pueden tener modificaciones de uno o varios residuos en la HVR. En una incorporación, una variante HVR-L2 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: B1 (M o L), B2 (P, T, G o S), B3 (N, G, R o T), B4 (I, N o F), B5 (P, I, L o G), B6 (A, D, T o V) y B7 (R, I, M o G). En una incorporación, una variante HVR-H1 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: D3 (N, P, L, S, A, I), D5 (I, S o Y), D6 (G, D, T, K, R), D7 (F, H, R, S, T o V) y D9 (M o V). En una incorporación, una variante HVR-H2 comprende 1-4 (1, 2, 3 o 4) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E7 (Y), E9 (T), E10 (I), E14 (T o Q), E15 (D, K, S, T o V), E16 (L), E17 (E, H, N o D) y E18 (Y, E o H). En una incorporación, una variante HVR-H3 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones

en cualquier combinación de las siguientes posiciones: F1 (T, S), F3 (R, S, H, T, A, K), F4 (G), F6 (R, F, M, T, E, K, A, L, W), F7 (L, I, T, R, K, V), F8 (S, A), F10 (Y, N) y F11 (Q, S, H, F). La(s) letra(s) entre paréntesis después de cada posición indica(n) un aminoácido ilustrativo de sustitución (es decir un reemplazo); como sería evidente para una persona con destreza en el arte, la idoneidad de otros aminoácidos como aminoácidos de sustitución en el contexto descrito en la presente, se puede evaluar de forma rutinaria empleando técnicas conocidas en el arte y/o descritas en la presente. En una incorporación, una HVR-L1 comprende la secuencia de SEQ ID No:1. En una incorporación, F1 en una variante HVR-H3 es T. En una incorporación, F1 en una variante HVR-H3 es S. En una incorporación, F3 en una variante HVR-H3 es R. En una incorporación, F3 en una variante HVR-H3 es S. En una incorporación, F7 en una variante HVR-H3 es T. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H3 donde F1 es T o S, F3 es R o S y F7 es T.

En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H3 donde F1 es T, F3 es R y F7 es T. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H3 donde F1 es S. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H3 donde F1 es T y F3 es R. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H3 donde F1 es S, F3 es R y F7 es T. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H3 donde F1 es T, F3 es S, F7 es T y F8 es S. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H3 donde F1 es T, F3 es S, F7 es T y F8 es A. En algunas incorporaciones, la citada variante HVR-H3 del anticuerpo comprende además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H2 donde cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4 y 5. En algunas incorporaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de soporte consensual de cadena pesada de subgrupo humano III. En una incorporación de estos anticuerpos, la secuencia de soporte consensual comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas incorporaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una incorporación de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de soporte consensual humano kl de cadena liviana.

En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L2 donde B6 es V. En algunas incorporaciones, la citada variante HVR-L2 del anticuerpo comprende además HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y

HVR-H3, donde cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEQ ID Nos: 1, 3, 4, 5 y 6. En algunas incorporaciones, la citada variante HVR-L2 del anticuerpo comprende además HVR- L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEQ ID Nos: 1, 3, 4, 5 y 7. En algunas incorporaciones, la citada variante HVR-L2 del anticuerpo comprende además HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEQ ID Nos: 1, 3, 4, 5 y 8. En algunas incorporaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de soporte consensual de cadena pesada de subgrupo humano III. En una incorporación de estos anticuerpos, la secuencia de soporte consensual comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas incorporaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una incorporación de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de soporte consensual humano kl de cadena liviana.

En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H2 donde E14 es T, E15 es K y E17 es E. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR- H2 donde E17 es E. En algunas incorporaciones, la citada variante HVR-H3 del anticuerpo comprende además HVR- L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H3 donde cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4 y 6. En algunas incorporaciones, la citada variante HVR-H2 del anticuerpo comprende además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H3, donde cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4 y 7. En algunas incorporaciones, la citada variante HVR-H2 del anticuerpo comprende además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H3, donde cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4 y 8. En algunas incorporaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de soporte consensual de cadena pesada de subgrupo humano III. En una incorporación de estos anticuerpos, la secuencia de soporte consensual comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas incorporaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una incorporación de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de soporte consensual humano kl de cadena liviana.

En un aspecto, la invención dispone un anticuerpo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias HVR representadas en las Figs. 2, 3 y/o 4 (SEQ ID Nos:56-163).

Un agente terapéutico para el uso en un individuo anfitrión preferiblemente produce poca o prácticamente ninguna respuesta inmunógena contra el agente en el citado individuo. En una incorporación, la invención dispone el citado agente. Por ejemplo, en una incorporación, la invención dispone un anticuerpo humanizado que produce y/o se espera que produzca una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) a un nivel sustancialmente reducido comparado con un anticuerpo que comprende la secuencia de SEQ ID No: 9 & 10 en un individuo anfitrión. En otro ejemplo, la invención dispone un anticuerpo humanizado que produce y/o se espera que produzca una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) mínima o inexistente. En un ejemplo, un anticuerpo de la invención produce respuesta de anticuerpo anti-ratón que se encuentra en un nivel mínimo o menos del mínimo clínicamente aceptable.

Un anticuerpo humanizado de la invención puede comprender una o varias secuencias de regiones humanas y/o de consenso humano no hipervariables (por ejemplo, soporte) en su dominio variable de cadena pesada y/o de cadena liviana. En algunas incorporaciones, una o varias modificaciones adicionales se encuentran presentes en las secuencias de regiones humanas y/o de consenso humano no hipervariables. En una incorporación, el dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de soporte humano consensual, que en una incorporación es la secuencia de soporte consensual del subgrupo III. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de soporte consensual variante de subgrupo III modificada en por lo menos una posición de aminoácido. Por ejemplo, en una incorporación, un subgrupo de la variante en la secuencia de soporte consensual puede comprender una sustitución en una o varias posiciones 71, 73 y/o 78. En una incorporación, la citada sustitución es R71A, N73T y/o N78A, en cualquier combinación de las mismas.

Como se conoce en el arte y como se describe en mayor detalle en la presente abajo, la posición/el límite del aminoácido que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar dependiendo del contexto y de las diferentes definiciones conocidas en el arte (como se describe abajo). Algunas posiciones en un dominio variable se pueden ver como unas posiciones hipervariables híbridas en cuanto que estas posiciones se pueden considerar dentro de una región hipervariable bajo un conjunto de criterios y se puede considerar por fuera de una región hipervariable bajo otro conjunto de criterios. Una o varias de estas posiciones también se puede(n) encontrar en regiones

hipervariables extendidas (como se define en más detalle abajo). La invención dispone anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. En una incorporación, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o varias de las posiciones 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94 y 102 en un dominio variable de cadena pesada. En una incorporación, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o varias de las posiciones 24-29, 35-36, 46-49, 56 y 97 en un dominio variable de cadena liviana. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de soporte consensual variante de subgrupo humano modificada en una o varias posiciones hipervariables híbridas. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de soporte consensual de subgrupo humano III variante modificada en una o varias posiciones 27- 28, 30, 33-35, 49, 57-65, 94 y 102. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución F27Y. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución T28N, P, L, S, A o I. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución S30I, T o Y. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución A33W. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución M34L o M34V. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución S35H. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución T57I. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución Y58R. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución Y59F. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución A60N. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución D61P, T o Q. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución S62N, D, K, T o V. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución V63F o V63L. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución K64E, H, N, D o Q. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución G65D, Y, E o H. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución R94T o R94S. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución Y102Q, S, H o F. En una incorporación, un anticuerpo de la invención que comprende la citada modificación R94T o R94S comprende además una o varias modificaciones en la posición 96 y/o 100. En una incorporación, las citadas modificaciones comprenden una sustitución G96R y/o S100T (es decir, en HVR-H3). En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende una secuencia de soporte consensual subgrupo kappa humano I variante modificada en una o varias posiciones 24, 25, 29 y 56. En una

incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución R24K. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución A25S. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución I29Q. En una incorporación, el anticuerpo comprende una sustitución S56R, I, M o G.

En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de soporte consensual subgrupo humano III variante modificada en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o en todas las posiciones 27-28, 30, 33-35, 49, 57-65, 94 y 102. En una incorporación, las modificaciones se seleccionan entre el grupo conformado por F27Y, T28(N, P, L, S, A o I), S30(I, T o Y), A33W, M34(L,V), S35H, T57I, Y58R, Y59F, A60N, D61(P, T, Q), S62(N, D, K, T,V), V63(F,L), K64(E, H, N, D, Q), G65(D, Y, E, H), R94(T,S) y Y102(Q, S, H, F). En una incorporación, un anticuerpo de la invención que comprende la citada modificación R94T o R94S comprende además una o varias modificaciones en la posición 96 y/o 100. En una incorporación, las citadas modificaciones comprenden una sustitución G96R y/o S100T (es decir, en HVR-H3).

En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende una secuencia de soporte consensual de subgrupo kappa humano I modificada en 1, 2, 3 o en todas las posiciones 24, 25, 29 y 56. En una incorporación, las modificaciones se seleccionan entre el grupo conformado por R24K, A25S, I29Q y S56(R, I, M, G).

Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquier secuencia de soporte de cadena liviana humana o de consenso humano, siempre que el anticuerpo cuente con las características biológicas deseadas (por ejemplo, una afinidad de unión deseada). En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una porción (o la totalidad) de la secuencia de soporte de la cadena liviana humana k. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una porción (o la totalidad) de la secuencia de soporte consensual del subgrupo I humano k.

En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada y/o liviana que comprende la secuencia de soporte representada en SEQ ID No: 13 y/o 16 (FIGURA 1), siempre que la posición 94 en la cadena pesada no es R (y es preferiblemente, pero no necesariamente S o T).

En un aspecto, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado anti-c-met que inhibe la unión del factor de crecimiento hepatocítico humano a su aceptor de mejor forma que un anticuerpo de referencia que comprende un

115
117

anticuerpo anti-c-met quimérico que comprende una secuencia variable de cadena liviana y de cadena pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID Nos: 9 y 10). Por ejemplo, en una incorporación, un anticuerpo de la invención inhibe la unión del FCH con un valor IC50 que es inferior a alrededor de la mitad del que le corresponde al anticuerpo quimérico. En una incorporación, el valor IC50 de un anticuerpo de la invención es alrededor de 0.1, 0.2, 0.3 o 0.4 del que le corresponde al anticuerpo quimérico. Es posible comparar las habilidades para inhibir la unión de FCH a su aceptor de acuerdo con diversos métodos conocidos en el arte, incluyendo como se describe en los Ejemplos a continuación. En una incorporación, los valores IC50 se determinan en un rango de concentración del anticuerpo de alrededor de 0.01 nM hasta alrededor de 1000 nM.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado anti-c-met que inhibe la activación del receptor del factor de crecimiento hepatocítico humano (FCH) mejor que un anticuerpo de referencia que comprende un anticuerpo anti-c-met quimérico que comprende una secuencia variable de cadena liviana y de cadena pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10). Por ejemplo en una incorporación, un anticuerpo de la invención inhibe la activación del receptor con un valor IC50 que es inferior a alrededor de la mitad del que corresponde al anticuerpo quimérico. En una incorporación, el valor IC50 de un anticuerpo de la invención es alrededor de 0.1, 0.2, 0.3 o 0.4 del que corresponde al anticuerpo quimérico. Es posible comparar las habilidades para inhibir la unión de FCH a su aceptor de acuerdo con diversos métodos conocidos en el arte, incluyendo como se describe en los Ejemplos a continuación. En una incorporación, los valores IC50 se determinan a través de un rango de concentración del anticuerpo desde alrededor de 0.1 nM hasta alrededor de 100 nM.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado anti-c-met que inhibe la proliferación celular c-met-dependiente mejor que un anticuerpo de referencia que comprende un anticuerpo anti-c-met quimérico que comprende una secuencia variable de cadena liviana y de cadena pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10). Por ejemplo, en una incorporación, un anticuerpo de la invención inhibe la proliferación celular con un valor IC50 que es inferior a alrededor de la mitad del que corresponde al anticuerpo quimérico. En una incorporación, el valor IC50 de un anticuerpo de la invención es alrededor de 0.1, 0.2, 0.3 o 0.4 del que corresponde al anticuerpo quimérico. Es posible comparar las habilidades para inhibir la proliferación celular

de acuerdo con varios métodos conocidos en el arte, incluyendo como se describe en los Ejemplos abajo. En una incorporación, los valores IC50 se determinan mediante un rango de concentración del anticuerpo de alrededor de 0.01 nM a alrededor de 100 nM.

En una incorporación, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico son monovalentes. En una incorporación, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico comprenden una sola región Fab enlazada a una región Fc. En una incorporación, el anticuerpo quimérico de referencia comprende secuencias de dominio variable representadas en Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10) enlazadas a una región humana Fc. En una incorporación, la región humana Fc es la de un IgG (por ejemplo, IgG 1, 2, 3 o 4).

En un aspecto, la invención dispone un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC representada en la Figura 13. En una incorporación, el dominio variable comprende la secuencia FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC representada en la Figura 13. En una incorporación, el anticuerpo comprende la secuencia CH1 y/o Fc representada en la Figura 13. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC y la secuencia FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC representada en la Figura 13. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC y la secuencia CH1 y/o Fc representada en la Figura 13. En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC y la secuencia FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC representada en la Figura 13 y la secuencia CH1 y/o Fc representada en la Figura 13. En una incorporación, la región Fc del anticuerpo de la invención comprende un complejo entre un polipéptido que comprende la secuencia Fc en la Figura 13 y un polipéptido que comprende la secuencia Fc en la Figura 14.

En un aspecto, la invención dispone un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC representada en la Figura 13. En una incorporación, el dominio variable comprende la secuencia FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC representada en la Figura 13. En una incorporación, el anticuerpo comprende la secuencia CL1 representada en la Figura 13.

En una incorporación, un anticuerpo de la invención comprende dominios variables de cadena liviana y de cadena pesada como se describe en los dos párrafos anteriores. En una incorporación, el anticuerpo es monovalente y comprende una región Fc. En una incorporación, la región Fc comprende por lo menos una protuberancia (prominencia) y por lo menos una cavidad (orificio), donde la presencia de la protuberancia y la cavidad mejora la formación de un complejo entre un polipéptido Fc que comprende la protuberancia y un polipéptido Fc que comprende la cavidad, por ejemplo como se describe en WO 2005/063816. En una incorporación, la región Fc de un anticuerpo de la invención comprende un primer y un segundo polipéptido Fc, donde el primer y el segundo polipéptido comprenden cada uno una o varias mutaciones con respecto al tipo humano Fc natural. En una incorporación, una mutación de cavidad es T366S, L368A y/o Y407V. En una incorporación, una mutación de protuberancia es T366W. En una incorporación, el primer polipéptido comprende la secuencia Fc representada en la Figura 13 y el segundo polipéptido comprende la secuencia Fc representada en la Figura 14.

Se pueden emplear antagonistas de la invención para modular uno o varios aspectos de los efectos asociados al FCH/c-met-, incluyendo pero no limitado a la activación c-met, señalización molecular descendente (por ejemplo, proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) fosforilación), proliferación celular, migración celular, supervivencia celular, morfogénesis celular y angiogénesis. Estos efectos se pueden modular mediante cualquier mecanismo biológicamente adecuado, incluyendo la alteración del ligando (por ejemplo, HGF) unión a c-met, c-met fosforilación y/o c-met multimerización. Por lo tanto, en una incorporación, la invención dispone un anticuerpo antagonista c-met que inhibe la unión del FCH al c-met. En una incorporación, un anticuerpo antagonista c-met de la invención altera la multimerización c-met (por ejemplo, dimerización). En una incorporación, un anticuerpo antagonista c-met de la invención altera la función de dimerización del dominio Sema c-met. En un ejemplo, un anticuerpo antagonista c-met interfiere con la habilidad del dominio Sema c-met para efectuar la dimerización c-met. La interferencia puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista c-met se puede unir a una secuencia en el dominio Sema c-met y en esta forma inhibe la interacción del citado dominio unido con su compañera de unión (como otra molécula c-met). En otro ejemplo, un anticuerpo antagonista c-met se puede unir a una secuencia que no se encuentra en el dominio Sema c-met, pero donde la citada unión resulta en la alteración de la habilidad del dominio

Sema c-met para interactuar con su compañera de unión (como molécula c-met). En una incorporación, un anticuerpo antagonista de la invención se fija a la c-met (por ejemplo, el dominio extracelular) de manera que la dimerización c-met se altera. En una incorporación, un anticuerpo antagonista de la invención se fija a la c-met de manera que la habilidad del dominio Sema c-met para efectuar la dimerización c-met se altera. Por ejemplo, en una incorporación, la invención dispone un anticuerpo antagonista el cual, en el momento de la unión a una molécula c-met, inhibe la dimerización de la citada molécula. En una incorporación, un anticuerpo antagonista c-met de la invención específicamente fija una secuencia en el dominio Sema c-met.

En una incorporación, un anticuerpo antagonista de la invención altera la dimerización c-met que comprende la homodimerización. En una incorporación, un anticuerpo antagonista de la invención altera la dimerización c-met que comprende la heterodimerización (es decir, la dimerización c-met con una molécula que no es c-met).

En algunos casos, puede ser una ventaja si se tiene un anticuerpo antagonista c-met que no interfiere con la unión de un ligando (como HGF) a una c-met. Por lo tanto, en una incorporación, la invención dispone un anticuerpo que no fija un sitio de unión FCH en una c-met. En otra incorporación, un anticuerpo de la invención sustancialmente no inhibe la unión de FCH a c-met. En una incorporación, un anticuerpo de la invención sustancialmente no compite con el FCH para la unión a la c-met. En un ejemplo, un anticuerpo antagonista de la invención se puede emplear conjuntamente con uno o varios antagonistas, donde los antagonistas son los blancos en diferentes procesos y/o funciones en el eje FCH/c-met. Por lo tanto, en una incorporación, un anticuerpo antagonista c-met de la invención se fija a un epítipo en una c-met diferente de un epítipo unido por otro c-met antagonista (como el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridomas depositadas bajo la Colección Americana de Cultivos de Tipo, Número de Acceso ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13)). En otra incorporación, un anticuerpo antagonista c-met de la invención es diferente a (es decir, no es) un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridomas depositado bajo la Colección Americana de Cultivos de Tipo, Número de Acceso ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13).

En una incorporación, la invención dispone un anticuerpo antagonista c-met que altera tanto la multimerización c-met como la unión al ligando. Por ejemplo,

un anticuerpo antagonista de la invención que inhibe la multimerización c-met (por ejemplo, la dimerización) puede comprender además una habilidad para competir con el FCH por la unión a una c-met.

En una incorporación de un anticuerpo antagonista c-met de la invención, la unión del antagonista a la c-met inhibe la activación c-met mediante el FCH. En otra incorporación de un anticuerpo antagonista c-met de la invención, la unión del antagonista a la c-met en una célula inhibe la proliferación, supervivencia, dispersión, morfogénesis y/o motilidad de la célula.

En una incorporación, un anticuerpo antagonista c-met de la invención específicamente fija por lo menos una porción del dominio Sema c-met o una variante del mismo. En un ejemplo, un anticuerpo antagonista de la invención específicamente fija por lo menos una de las secuencias seleccionadas entre el grupo conformado por LDAQT (SEQ ID No: 15) (por ejemplo, residuos 269-273 de la c-met), LTEKRKKRS (SEQ ID No: 16) (por ejemplo, residuos 300-308 de la c-met), KPDSAEPM (SEQ ID No: 17) (por ejemplo, residuos 350-357 de la c-met) y NVRCLQHF (SEQ ID No: 18) (por ejemplo, residuos 381-388 de la c-met). En una incorporación, un anticuerpo antagonista de la invención específicamente se fija a un epítotope de conformación formado por parte o la totalidad de por lo menos una de las secuencias seleccionadas entre el grupo conformado por LDAQT (por ejemplo, residuos 269-273 de la c-met), LTEKRKKRS (por ejemplo, residuos 300-308 de la c-met), KPDSAEPM (por ejemplo, residuos 350-357 de la c-met) y NVRCLQHF (por ejemplo, residuos 381-388 de la c-met). En una incorporación, un anticuerpo antagonista de la invención específicamente fija una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad o similitud de secuencia de por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% con la secuencia LDAQT, LTEKRKKRS, KPDSAEPM y/o NVRCLQHF.

En una incorporación, un anticuerpo de la invención específicamente se fija al aceptor FCH de una primera especie animal y específicamente no se fija al aceptor FCH de una segunda especie animal. En una incorporación, la primera especie animal es humana y/o primate (por ejemplo, el mono de Java) y la segunda especie animal es murina (por ejemplo, ratón) y/o canina. En una incorporación, la primera especie animal es humana. En una incorporación, la primera especie animal es primate, por ejemplo mono de Java. En una incorporación, la segunda especie animal es murina, por ejemplo ratón. En una incorporación, la segunda especie animal es canina.

En un aspecto, la invención dispone composiciones que comprenden uno o varios anticuerpos antagonistas de la invención y un excipiente. En una incorporación, el excipiente es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención dispone ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo antagonista c-met de la invención.

En un aspecto, la invención dispone vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

En un aspecto, la invención dispone células anfitrionas que comprenden un ácido nucleico o un vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo un vector recombinante como un vector de expresión. Se pueden emplear cualquiera entre una variedad de células anfitrionas. En una incorporación, una célula anfitriona es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. En una incorporación, una célula anfitriona es una célula eucariota, por ejemplo una célula de mamífero como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

En un aspecto, la invención dispone métodos para manufacturar un antagonista de la invención. Por ejemplo, la invención dispone un método para fabricar un anticuerpo antagonista c-met (el cual, como se define en la presente, comprende su longitud total y fragmentos del mismo), el citado método que comprende expresar un vector recombinante de la invención en una célula anfitriona apropiada que codifica el citado anticuerpo (o un fragmento del mismo) y recuperar el citado anticuerpo.

En un aspecto, la invención dispone un artículo de manufactura que comprende un envase; y una composición contenida en el envase, donde una composición comprende uno o varios anticuerpos antagonistas c-met de la invención. En una incorporación, una composición comprende un ácido nucleico de la invención. En una incorporación, una composición que comprende un anticuerpo antagonista y comprende además un excipiente, el cual, en algunas incorporaciones es farmacéuticamente aceptable. En una incorporación, un artículo de manufactura de la invención comprende además instrucciones para administrar una composición (por ejemplo, el anticuerpo antagonista) a un individuo.

En un aspecto, la invención dispone un estuche que comprende un primer envase que comprende una composición que comprende uno o varios anticuerpos antagonistas c-met de la invención; y un segundo envase que comprende una solución amortiguadora. En una incorporación, la solución amortiguadora es farmacéuticamente aceptable. En una incorporación, una composición que

comprende un anticuerpo antagonista comprende además un excipiente, el cual, en algunas incorporaciones es farmacéuticamente aceptable. En una incorporación, un estuche comprende además instrucciones para administrar una composición (por ejemplo, el anticuerpo antagonista) a un individuo.

En un aspecto, la invención dispone el uso de un anticuerpo antagonista c-met de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, como un cáncer, un tumor, un desorden relacionado con la proliferación celular, un desorden inmune (como autoinmune) y/o un desorden relacionado con la angiogénesis. En un aspecto, la invención dispone el uso de un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, como un cáncer, un tumor, un desorden relacionado con la proliferación celular, un desorden inmune (como autoinmune) y/o un desorden relacionado con la angiogénesis.

En un aspecto, la invención dispone el uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, como un cáncer, un tumor, un desorden relacionado con la proliferación celular, un desorden inmune (como autoinmune) y/o un desorden relacionado con la angiogénesis.

En un aspecto, la invención dispone el uso de una célula anfitriona de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, como un cáncer, un tumor, un desorden relacionado con la proliferación celular, un desorden inmune (como autoinmune) y/o un desorden relacionado con la angiogénesis.

En un aspecto, la invención dispone el uso de un artículo de manufactura de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, como un cáncer, un tumor, un desorden relacionado con la proliferación celular, un desorden inmune (como autoinmune) y/o un desorden relacionado con la angiogénesis.

En un aspecto, la invención dispone el uso de un estuche de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, como un cáncer, un tumor, un desorden relacionado con la proliferación celular, un desorden inmune (como autoinmune) y/o un desorden relacionado con la angiogénesis.

La invención dispone métodos y composiciones útiles para modular estados de enfermedades asociadas con la desregulación del eje de señalización FCH/c-

met. La vía de señalización FCH/c-met está comprometida en múltiples funciones biológicas y fisiológicas, incluyendo, por ejemplo, la proliferación celular y la angiogénesis. Por lo tanto, en un aspecto, la invención dispone un método que comprende administrar a un individuo un anticuerpo de la invención.

En un aspecto, la invención dispone un método para inhibir la proliferación celular activada por c-met, el citado método que comprende poner en contacto una célula o un tejido con una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, mediante el cual la proliferación celular asociada a la activación c-met queda inhibida.

En un aspecto, la invención dispone un método para tratar una condición patológica asociada a la desregulación de la activación c-met en un individuo, el citado método que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, mediante el cual se trata la citada condición.

En un aspecto, la invención dispone un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa la c-met o el factor de crecimiento hepatocítico, o ambos, el citado método que comprende poner en contacto la citada célula con un anticuerpo de la invención produciendo en esta forma la inhibición del crecimiento de la citada célula. En una incorporación, la célula es contactada por el FCH expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

En un aspecto, la invención dispone un método para tratar un mamífero en forma terapéutica que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa la c-met o el factor de crecimiento hepatocítico, o ambos, el citado método que comprende administrar al citado mamífero una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, y en esta forma efectivamente tratar el citado mamífero. En una incorporación, la célula es contactada por el FCH expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

En un aspecto, la invención dispone un método para tratar o prevenir un desorden relacionado con la proliferación celular asociado con una mayor expresión o actividad de la c-met o el crecimiento hepatocítico, o ambos, el citado método que comprende administrar a un individuo que necesite el citado tratamiento una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, y en esta forma efectivamente tratar o prevenir el citado desorden de proliferación celular. En una incorporación, el citado desorden de proliferación es cáncer.

En un aspecto, la invención dispone un método para inhibir el crecimiento de una célula, donde el crecimiento de la citada célula depende por lo menos en parte, de un efecto intensificador del crecimiento de la c-met o del factor de

127
125

crecimiento hepatocítico, o ambos, el citado método que comprende poner en contacto la citada célula con una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, y en esta forma inhibir el crecimiento de la citada célula. En una incorporación, la célula es contactada por el FCH expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

Un método para tratar un tumor de un mamífero en forma terapéutica, donde el crecimiento del citado tumor depende por lo menos en parte, de un efecto intensificador del crecimiento de la c-met o del factor de crecimiento hepatocítico, o ambos, el citado método que comprende poner en contacto la citada célula con una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, y en esta forma efectivamente tratar el citado tumor. En una incorporación, la célula es contactada por el FCH expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

Se pueden emplear los métodos de la invención para afectar cualquier estado patológico apropiado, por ejemplo, las células y/o los tejidos asociados a la desregulación de la vía de señalización del FCH/c-met. En una incorporación, una célula que se busca fijar como objetivo en un método de la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una célula seleccionada entre el grupo conformado por una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer papilar (por ejemplo, de la glándula tiroides), una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer ovárico, una célula de cáncer cervical, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga, una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, una célula de melanoma y una célula de leucemia. En una incorporación, una célula que se busca fijar como objetivo en un método de la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una incorporación, una célula que se busca fijar como objetivo en un método de la invención es una célula displásica. En aún otra incorporación, una célula que se busca fijar como objetivo en un método de la invención es una célula metastásica.

Los métodos de la invención pueden comprender además unos pasos de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una incorporación, un método comprende además un paso donde una célula y/o un tejido objetivo (por ejemplo, una célula

124
125

cancerosa) se exponen a un tratamiento de radiación o a un agente quimioterapéutico.

Como se describe en la presente, la activación c-met es un proceso biológico importante, cuya desregularización desencadena numerosas condiciones patológicas. Por lo tanto, en una incorporación de los métodos de la invención, una célula que se busca fijar como objetivo (por ejemplo, una célula cancerosa) es una donde la activación de la c-met se mejora cuando se compara con una célula normal del mismo tejido de origen. En una incorporación, un método de la invención ocasiona la apoptosis de una célula objetivo. Por ejemplo, el contacto con un antagonista de la invención puede resultar en la incapacidad de una célula de enviar una señal mediante la vía c-met, ocasionando la apoptosis.

La desregulación de la activación c-met (y por lo tanto la señalización) puede ser el resultado de numerosos cambios celulares, incluyendo, por ejemplo, la hiperexpresión del FCH (ligando c-met afin) y/o una c-met misma. Por lo tanto, en algunas incorporaciones, un método de la invención comprende fijar como objetivo una célula donde la c-met o el factor de crecimiento hepatocítico, o ambos, se expresan en forma más abundante por la citada célula (por ejemplo, una célula cancerosa) cuando se compara con una célula normal del mismo tejido de origen. Una célula que expresa la c-met-puede regularse por el FCH a partir de una variedad de fuentes, es decir en forma autocrina o paracrina. Por ejemplo, en una incorporación de los métodos de la invención, una célula objetivo está contactada/unida por el factor de crecimiento hepatocítico expresado en una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino). La citada célula diferente puede ser del mismo tejido de origen o de otro. En una incorporación, una célula objetivo está contactada/unida por el FCH expresado por la célula objetivo misma (por ejemplo, mediante un efecto/una vuelta autocrino). La activación c-met y/o la señalización también puede ocurrir en forma independiente del ligando. Por lo tanto, en una incorporación de los métodos de la invención, la activación c-met en una célula objetivo ocurre en forma independiente del ligando.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 representa la alineación de secuencias de las cadenas livianas y pesadas variables para lo siguiente: secuencia consensual de cadena liviana de subgrupo humano I, secuencia consensual de cadena pesada de subgrupo

humano III, anticuerpo anti-c-met murino 5D5 y anticuerpo "humanizado" 5D5-transplantado.

FIG. 2 representa varias secuencias HVR de anticuerpos con afinidad madurada seleccionadas de bibliotecas con HVR seleccionadas en forma aleatoria individualmente.

FIG. 3 representa secuencias HVR-H3 de anticuerpos con afinidad madurada seleccionadas en un conjunto de bibliotecas que comprenden una combinación de 6 bibliotecas abarcando los seis HVRs donde cada biblioteca se selecciona en forma aleatoria en un solo HVR.

FIG. 4 representa los resultados del análisis Biacore de anticuerpos anti-c-met seleccionados.

FIG. 5A,B & 6A,B representan ejemplos de secuencias aceptoras de soporte humano consensual para el uso en la práctica de la invención instantánea con identificadores de secuencia como sigue:

Soportes Consensuales Variables Pesados (VH) (FIG. 5A, B)

- soporte consensual humano VH subgrupo I menos Kabat CDRs (SEQ ID No: 19)
- soporte consensual humano VH subgrupo I menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos : 20- 22)
- soporte consensual humano VH subgrupo II menos Kabat CDRs (SEQ ID No: 23)
- soporte consensual humano VH subgrupo II menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:24-26)
- soporte consensual humano VH subgrupo HI menos Kabat CDRs (SEQ ID No:27)
- soporte consensual humano III subgrupo HI menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:28-30)
- soporte consensual humano aceptor VH menos Kabat CDRs (SEQ ID No:31)
- soporte consensual humano aceptor VH menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:32-33)
- soporte consensual humano aceptor VH 2 menos Kabat CDRs (SEQ ID No:34)
- soporte consensual humano aceptor VH 2 menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:35-37)

Soportes Consensuales Variables Livianos (VL) (FIG. 6A,B)

- soporte consensual subgrupo I kappa humano VL(SEQ ID NO: 38)
- soporte consensual subgrupo II kappa humano VL(SEQ ID NO:39)
- soporte consensual subgrupo HI kappa humano VL(SEQ ID NO:40)
- soporte consensual subgrupo IV kappa humano VL(SEQ ID NO:41)

FIG. 7 representa secuencias de dominio variable donante (anticuerpo murino 5D5) cadena liviana (LC) y cadena pesada (HC).

FIG. 8 representa los datos gráficos para bloquear la unión del FCH a su aceptor mediante un anticuerpo de la invención.

FIG. 9 representa los datos gráficos para la inhibición de la activación del receptor FCH mediante un anticuerpo de la invención.

FIG. 10 representa los datos gráficos para la inhibición de la proliferación celular mediante un anticuerpo de la invención. "rchOA5D5 HGF" hace referencia a un anticuerpo quimérico 5D5 de un brazo más el FCH; "rhuOA5D5v2 HGF" hace referencia a OA5D5.V2 más el FCH; "rhuOA5D5v1l HGF" hace referencia a OA5D5.v1 más el FCH". "Control rchOA5D5" hace referencia a un anticuerpo quimérico 5D5 de un brazo sin el FCH; "Control rhuOA5D5v2" hace referencia a OA5D5.v2 sin el FCH; "Control rhuOA5D5v1" hace referencia a OA5D5.v1 sin el FCH".

FIG. 11A, B representa datos para la inhibición de la fosforilación del aceptor en presencia de un anticuerpo de la invención. La Fig. 11A representa la fosforilación del aceptor de las células H358. La Fig. 11B representa la fosforilación del aceptor de las células H358 transinfectadas con el FCH.

Fig. 12 representa los datos gráficos que muestran la eficacia *in vivo* de un anticuerpo de la invención. "TI" hace referencia a la frecuencia de un tumor. TI=8/10 hace referencia a que 8 ratones entre un grupo de 10 ratones tienen tumores. TI=2/8 hace referencia a que 2 ratones entre un grupo de 8 ratones tienen tumores.

FIG. 13 representa secuencias de aminoácidos del soporte (FR), región hipervariable (HVR), primer dominio constante (CL o CH1) y la región Fc (Fc) de una incorporación de un anticuerpo de la invención (5D5.v2). La secuencia Fc descrita comprende mutaciones "orificio" (cavidad) T366S, L368A y Y407V, como se describe en WO 2005/063816.

FIG. 14 representa la secuencia de un polipéptido Fc que comprende una mutación "prominencia" (protuberancia) T366W, como se describe en WO 2005/063816. En una incorporación, un polipéptido Fc que comprende esta secuencia forma un complejo con un polipéptido Fc que comprende la secuencia Fc de la Fig. 13 para generar una región Fc de un anticuerpo de la invención.

FORMAS PARA EFECTUAR LA INVENCION

La invención dispone unos métodos, unas composiciones, unos estuches y unos artículos de manufactura para identificar y/o utilizar inhibidores de la vía de señalización del FCH/c-met.

Los detalles de estos métodos, estas composiciones, estos estuches y artículos de manufactura se disponen en la presente.

Técnicas Generales

La práctica de la presente invención va a emplear, salvo si se indica en contrario, unas técnicas convencionales de biología molecular convencional (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, todas las cuales están dentro de las destrezas del arte. Dichas técnicas se explican en detalle en la literatura, como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y colaboradores, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel y colaboradores, eds., 1987 y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polimerase Chain Reaction", (Mullis y colaboradores, ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas y colaboradores, 2001).

Definiciones

Una "modificación" de un residuo/una posición de un aminoácido, como se emplea en la presente, hace referencia a un cambio de una secuencia del aminoácido primario cuando se compara con una secuencia del aminoácido de partida, donde el cambio se debe a una alteración de la secuencia que compromete el citado residuo/las posiciones del aminoácido. Por ejemplo, las modificaciones típicas comprenden la sustitución del residuo (o en la citada posición) con otro aminoácido (por ejemplo, una sustitución conservadora o no conservadora), la inserción de uno o varios (generalmente menos de 5 o 3) aminoácidos adyacentes al citado residuo/posición y la eliminación del citado residuo/posición. Una "sustitución de aminoácido" o una variación del mismo, hace referencia al reemplazo de un residuo de un aminoácido existente en una secuencia de aminoácido determinada (de partida) con un residuo de aminoácido diferente. Generalmente y preferiblemente, la modificación resulta en la alteración en por lo menos una actividad físico-química del polipéptido variante

comparado con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de partida (o de "tipo natural"). Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, una actividad físico-química que se altera puede ser la afinidad de unión, la capacidad de unión y/o el efecto de unión en una molécula objetivo.

Un "anticuerpo aislado" es aquel que fue identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural forman un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no-proteínicos. En incorporaciones preferidas, el anticuerpo será purificado (1) a más del 95% por peso de anticuerpo como se determina en el método Lowry y más preferiblemente más de 99% por peso, (2) hasta un grado suficiente que permita la obtención de por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácido N-terminal o interno mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o de no-reducción empleando mancha de Coomassie azul o preferiblemente, mancha plateada. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo *in situ* en células recombinantes puesto que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, por lo general el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos un paso de purificación.

El término "numeración de residuo de dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácido como en Kabat" y variaciones de los mismos, hacen referencia al sistema de numeración empleada para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena liviana de la compilación de anticuerpos en Kabat y colaboradores, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Edición 5, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia linear de aminoácido puede contener menos aminoácidos o incluso unos aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de o a una inserción en un FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una sola inserción de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de cadena pesada FR. La numeración Kabat de los residuos se puede determinar para cierto anticuerpo mediante la alineación en regiones de homología

de la secuencia del anticuerpo con una secuencia de numeración de Kabat "estándar".

La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se emplea en la presente, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación, de manera que una persona con destreza en el arte consideraría la diferencia entre los dos valores como muy poca o sin ningún significado biológico y/o estadístico en el contexto de la característica biológica medida por los citados valores (por ejemplo, valores K_d). La diferencia entre los dos valores citados es preferiblemente menos de alrededor de 50%, preferiblemente menos de alrededor de 40%, preferiblemente menos de alrededor de 30%, preferiblemente menos de alrededor de 20%, preferiblemente menos de alrededor de 10% como una función del valor para el anticuerpo de referencia/comparación.

"Afinidad de unión" generalmente hace referencia a la solidez de la suma total de interacciones no covalente entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañera de unión (por ejemplo, un antígeno). Salvo si se indica en contrario, como se emplea en la presente, "afinidad de unión" hace referencia a la afinidad de unión intrínseca que refleja un interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su compañera Y generalmente se puede representar en la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir por medio de unos métodos comunes conocidos en el arte, incluyendo aquellos descritos en la presente. Los anticuerpos de poca afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno de manera más rápida y tienden a mantenerse unidos por más tiempo. En el arte se conoce una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, y cualquiera de ellos se puede emplear con los fines de la presente invención. A continuación se describen unas incorporaciones ilustrativas específicas.

En una incorporación, la " K_d " o el "valor K_d " de acuerdo con esta invención, se mide a través de un análisis de unión de antígeno radio marcado (RIA) efectuado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, como se describe en el siguiente análisis que mide la afinidad de unión de la solución de Fabs para el antígeno equilibrando el Fab con concentraciones mínimas de (125 I)-antígeno marcado en presencia de una serie de titulaciones de un antígeno sin

marcar, luego capturar el antígeno fijado con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen y colaboradores, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para establecer las condiciones del análisis, las placas de microlitro (Dynex) se recubren durante la noche con 5 ug/ml de un anticuerpo que captura el anti-Fab (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9.6) y posteriormente se bloquean con 2% (peso/volumen) albúmina de suero bovino en PBS por un periodo de entre dos y cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no absorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM [¹²⁵I]-el antígeno se mezcla con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta y colaboradores, (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). Luego el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede proseguir por un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurarse de alcanzar el equilibrio. Posteriormente las mezclas se trasladan a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Luego se retira la solución y la placa se lava ocho veces con 0.1% Tween-20 en PBS. Cuando las placas se encuentran secas, se agrega 150 ul/pozo de centelleo (MicroScint-20; Packard) y las placas se someten a conteo en un contador Topcount gamma (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que indican menos o igual al 20% de unión máxima se escogen para el uso en un análisis de unión competitiva. De acuerdo con otra incorporación, la K_d o el valor K_d se mide mediante un análisis de resonancia por plasmón de superficie utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™_3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con fracciones de antígeno CM5 inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan fracciones biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con *N*-etil-*N*'-(3- dimetilaminopropil)-clorhidrato de carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10mM de acetato de sodio, pH 4.8, en 5ug/ml (~0.2uM) antes de inyección a una tasa de flujo de 5ul/minuto para obtener aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta 1M de etanolamina para bloquear los grupos que no reaccionaron. Para las mediciones cinéticas, dos veces se inyectan diluciones seriales de Fab (0.78 nM a 500 nM) en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25ul/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan empleando un modelo simple de unión Langmuir uno-a-uno (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2)

ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y de disolución. La constante de disociación del equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Consultar por ejemplo, Chen, Y. y colaboradores, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Si la tasa de activación (*on rate*) sobrepasa $10^6 M^{-1} S^{-1}$ por el análisis de resonancia por plasmón de superficie arriba, entonces se puede determinar la tasa de activación empleando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de la emisión fluorescente (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm sobrepaso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno de 20 nM (Forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de un aumento de las concentraciones de antígeno medido en un espectrómetro, como un espectrofómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofómetro serie 8000 de SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación.

De acuerdo con esta invención, una "tasa de activación" o una "tasa de asociación" en una " k_{on} " también se puede determinar con la misma técnica de resonancia por plasmón de superficie descrita arriba empleando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con fracciones de antígeno inmovilizado CM5 a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan fracciones de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-clorhidrato de carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10mM de acetato de sodio, pH 4.8, en 5ug/ml (~0.2uM) antes de inyección a una tasa de flujo de 5ul/minuto para obtener aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después se inyecta 1M de etanolamina para bloquear los grupos que no reaccionaron. Para las mediciones cinéticas, dos veces se inyectan diluciones seriales de Fab (0.78 nM a 500 nM) en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25ul/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan empleando un modelo simple de unión Langmuir uno-a-uno (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y de disolución. La constante de disociación del equilibrio (K_d) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} . Consultar por ejemplo, Chen, Y. y colaboradores, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Sin embargo, si la tasa de activación sobrepasa $10^6 M^{-1} S^{-1}$ por el análisis de resonancia por plasmón de superficie arriba, entonces la tasa de activación se determina preferiblemente empleando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la

reducción de la intensidad de la emisión fluorescente (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm sobrepaso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno de 20 nM (Forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de un aumento de las concentraciones de antígeno como se mide en un espectrómetro, como un espectrofómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofómetro serie 8000 de SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación. En una incorporación, el "kd" o el "valor Kd" de acuerdo con esta invención se mide mediante un análisis de unión de radioantígeno marcado (RIA) efectuado con la versión Fab del anticuerpo y la molécula del antígeno como se describe en el siguiente análisis que mide la afinidad de la unión de la solución de Fabs para el antígeno equilibrando el Fab con una concentración mínima de (¹²⁵I)-antígeno marcado en presencia de una serie de titulaciones de un antígeno marcado, luego capturar el antígeno unido con una placa recubierta con antígeno anti-Fab (Chen y colaboradores, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para establecer las condiciones del análisis, las placas de microlitro (Dynex) se recubren durante la noche con 5 ug/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9.6) y posteriormente se bloquea con 2% (peso/volumen) albúmina de suero bovino en PBS por un periodo de entre dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no-adsorbente (Nunc #269620), se mezclan 100 pM o 26 pM [¹²⁵I]- antígeno con diluciones seriadas de un Fab de interés (consistente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta y colaboradores, (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). Luego el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo la incubación puede continuar durante un periodo más prolongado (por ejemplo, 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Posteriormente las mezclas se trasladan a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente durante una hora. Luego se retira la solución y la placa se lava ocho veces con 0.1% Tween-20 en PBS. Cuando las placas se encuentran secas, se agrega 150 ul/pozo de *scintillant* (MicroScint-20; Packard) y las placas se someten a conteo en un contador Topcount gamma (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada FAb que dan menos de o igual a 20% de unión máxima se escogen para el uso en el análisis de unión competitiva. De acuerdo con otra incorporación, el Kd o el valor Kd se mide empleando el análisis de resonancia por plasmón de superficie empleando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25C con fracciones de antígeno inmovilizado CM5 a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan fracciones de

137
135

biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropil)-clorhidrato de carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10mM de acetato de sodio, pH 4.8, en 5ug/ml (~0.2uM) antes de inyección a una tasa de flujo de 5ul/minuto para obtener aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta 1M de etanolamina para bloquear los grupos que no reaccionaron. Para las mediciones cinéticas, dos veces se inyectan diluciones seriales de Fab (0.78 nM a 500 nM) en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25ul/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan empleando un modelo simple de unión Langmuir uno-a-uno (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y de disolución. La constante de disociación del equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Consultar por ejemplo, Chen, Y. y colaboradores, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Si la tasa de activación sobrepasa $10^6 M^{-1} S^{-1}$ por el análisis de resonancia por plasmón de superficie arriba, entonces se puede determinar la tasa de activación empleando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de la emisión fluorescente (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm sobrepaso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno de 20 nM (Forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de un aumento de las concentraciones de antígeno medido en un espectrómetro, como un espectrofómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofómetro serie 8000 de SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación.

En una incorporación, una "tasa de activación" o una "tasa de disociación" o una "tasa de asociación" o " k_{on} " de acuerdo con esta invención, se determina con la misma técnica de resonancia por plasmón de superficie descrita arriba empleando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25C con fracciones de antígeno inmovilizado CM5 a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan fracciones de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con *N*-etil-*N'*- (3- dimetilaminopropil)-clorhidrato de carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10mM de acetato de sodio, pH 4.8, en 5ug/ml (~0.2uM) antes de inyección a una tasa de flujo de 5ul/minuto para obtener aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después se inyecta 1M etanolamina para bloquear los grupos

que no reaccionaron. Para las mediciones cinéticas, dos veces se inyectan diluciones seriales de Fab (0.78 nM a 500 nM) en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25ul/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan empleando un modelo simple de unión Langmuir uno-a-uno (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y de disolución. La constante de disociación del equilibrio (K_d) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} . Consultar por ejemplo, Chen, Y. y colaboradores, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Sin embargo, si la tasa de activación sobrepasa $10^6 M^{-1} S^{-1}$ por el análisis de resonancia por plasmón de superficie arriba, entonces la tasa de activación se determina preferiblemente empleando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de la emisión fluorescente (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm sobrepaso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno de 20 nM (Forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de un aumento de las concentraciones de antígeno como se mide en un espectrómetro, como un espectrofómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofómetro serie 8000 de SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación.

La frase “sustancialmente reducido” o “sustancialmente diferente” como se emplea en la presente, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación, de manera que una persona con destreza en el arte consideraría la diferencia entre los dos valores como muy poca o sin ningún significado biológico y/o estadístico en el contexto de la característica biológica medida por los citados valores (por ejemplo valores K_d , respuesta HAMA). La diferencia entre los dos valores citados es preferiblemente mayor a alrededor de 10%, preferiblemente mayor a alrededor de 20%, preferiblemente mayor a alrededor de 30%, preferiblemente mayor a alrededor de 40%, preferiblemente mayor a alrededor de 50% como una función del valor para el anticuerpo de referencia/comparación.

“Por ciento (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia peptida o polipéptida se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que es idéntico a los residuos de aminoácidos en la secuencia peptida o polipéptida específica, después de alinear las secuencias e introducir brechas, de ser necesario, para obtener el porcentaje de la máxima identidad posible y sin considerar sustituciones conservadoras como

135
137

parte de la identidad de la secuencia. La alineación con el objeto de determinar el porcentaje de la máxima identidad posible de la secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias formas, dentro de las destrezas del arte, por ejemplo empleando un software de computador disponible para el público como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos con destreza en el arte pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo que pudiera ser necesario para alcanzar la alineación máxima a todo lo largo de las secuencias que se están comparando. Sin embargo, para los efectos de la presente, los valores del % de identidad de la secuencia de aminoácidos se generan empleando el programa de computador de comparación de secuencia ALIGN-2, donde el código completo de fuente del programa ALIGN-2 se dispone en la Tabla A abajo. Genentech, Inc es el autor del programa de computador ALIGN-2 para la comparación de secuencias y el código de fuente que aparece en la Tabla A abajo está registrado bajo documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde se encuentra registrado bajo el Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público en Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede recopilar del código de fuente, dispuesto en la Figura 8 abajo. El programa ALIGN-2 se debe compilar para ser empleado en un sistema operativo UNIX, preferiblemente digital UNTX V4.0D. El programa ALIGN-2 fija todos los parámetros de comparación de secuencia y no varían.

En situaciones en las cuales se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos para determinada secuencia de aminoácidos A, frente a, con o contra determinada secuencia de aminoácidos B (lo cual también se puede decir como determinada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende cierto % de identidad de la secuencia de aminoácidos frente a, con o contra determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos totalizados como compatibilidades idénticas por el programa ALIGN-2 de alineación de secuencia de A y B y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a

la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B a A.

Salvo si se indica específicamente en contrario, todos los % de los valores de identidad de la secuencia de aminoácidos empleados en la presente se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior empleando el programa de computador ALIGN-2.

Tabla A

/*

*

* C-C increased from 12 to 15

* Z is average of EQ

* B is average of ND

* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match =

*/

#define _M -8 /*value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {

/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */

/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},

/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},

/* C */ { -2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},

/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},

/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},

/* F */ { -4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},

/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},

/* H */ { -1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},

/* I */ { -1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},

/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},

/* K */ { -1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},

/* L */ { -2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},

/* M */ { -1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},

/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},

/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},

/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},

```

/* Q */ { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */ { -2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */ { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */ { -6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, OJM, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ { -3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */ { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, IJM, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4},
};

```

```
/*
```

```
*/
```

```
#include <stdio.h>
```

```
#include <ctype.h>
```

```
#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
```

```
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this
*/
```

```
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
```

```
#define MX 4 /* save if there's at least MX-I bases since last
jmp */
```

```
#define DMAT 3 /* value of matching bases */
```

```
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
```

```
#define DINSO 8 /* penalty for a gap */
```

```
#define DINSI 1 /* penalty per base */
```

```
#define PINSO 8 /* penalty for a gap */
```

```
#define PINSI 4 /* penalty per residue */
```

```
struct jmp {
```

```
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
```

```
    unsigned short X[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
```

```
/* limits seq to 2^16-1*/
```

```
};
```

138
140

```
struct diag {
    int          score;          /* score at last jmp */
    long         offset;         /* offset of prev block */
    short        jmp;           /* current jmp index */
    struct jmp    jp;           /* list of jmps */
};
```

```
struct path {
    int          spc;            /* number of leading spaces */
    short        n[JMPs];       /* size of jmp (gap) */
    int          X[JMPs];       /* loc of jmp (last elem before gap) */
};
```

```
char          *ofile;          /* output file name */
char          *namex[2];       /* seq names: getseqs() */
char          *prog;           /* prog name for err msgs */
char          *seqx[2];        /* seqs: getseqs() */
int           dmax;            /* best diag: nw() */
int           dmax0;           /* final diag */
int           dna;             /* set if dna: main() */
int           endgaps;         /* set if penalizing end gaps */
int           gapx, gapy;      /* total gaps in seqs */
int           len0, len1;      /* seq lens */
int           ngapx, ngapy; ;  /* total size of gaps */
int           smax;            /* max score: nw() */
int           *xbm;            /* bitmap for matching */
long          offset;          /* current offset in jmp file */
struct diag   *dx;             /* holds diagonals */
struct path   pp[2];           /* holds path for seqs */
```

```
char          *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char          *getseq(), *g_calloc();
```

```
/*Needleman-Wunsch alignment program *
```

```
*
```

129
141

```
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
```

```
#include "nw.h"
```

```
#include "day.h"
```

```
static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};
```

```
static _pbval[26] = {
    1, 2[(1<<('D'-'A'))](1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25[(1<<('E'-'A'))](1<<('Q'-'A'))
};
```

```
main(ac, av)
```

main

```
    int ac;
```

```
    char *av[];
```

```
{
```

```
    prog = av[0];
```

```
    if (ac != 3) {
```

```
        fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
```

```
        fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein
sequences.\n");
```

```
        fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
```


144
143

```
register      id;                /* diagonal index */
register      ij;                /* jmp index */
register      *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
register      xx, yy;            /* index into seqs */
```

```
dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+lenl+1, sizeof(struct diag));
```

```
ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", lenl+1, sizeof(int));
```

```
dely = (int *)g_calloc("to get dely", lenl+1, sizeof(int));
```

```
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", lenl+1, sizeof(int));
```

```
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", lenl+1, sizeof(int));
```

```
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
```

```
ins1 = (dna)? DESfSI : PINSI;
```

```
smax = -10000;
```

```
if (endgaps) {
```

```
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= lenl; yy++) {
```

```
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - insl;
```

```
        ndely[yy] = yy;
```

```
    }
```

```
    col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
```

```
}
```

```
else
```

```
    for (yy = 1; yy <= lenl; yy++)
```

```
        dely[yy] = -ins0;
```

```
/* fill in match matrix
```

```
*/
```

```
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
```

```
    /* initialize first entry in col
```

```
    */
```

```
    if (endgaps) {
```

```
        if (xx == 1)
```

```
            col1[0] = delx = -(ins0+insl);
```

```
        else
```

```
            col1[0] = delx = col0[0] - insl;
```

```

        ndelx = xx;
    }
    else {
        col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
    }

```

...nw

```

for (py = seqx[l], yy = 1; yy <= lenl; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-l];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
    * favor new del over ongong del
    * ignore MAXGAP if weighting endgaps
    */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            delyfyy = col0fyy - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }
}

```

~~143~~
145

```
/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongong del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (coll[yy-l] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1
    } else {
        delx -= insl;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-l] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1l[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}
```

```
/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */
```

...nw

```
id = xx - yy + lenl - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1fyy] = mis;
else if (delx >= delyfyy) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO))
{
```

~~144~~
146

```
dx[id].ijmp++;
if (++ij >= MAXJMP) {
    writejmps(id);
    ij = dx[id].ijmp = 0;
    dx[id].offset = offset;
    offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
}
}
dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
dx[id].jp.x[ij] = xx;
dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0]&& (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO))
{
    dx[id].ijmp++;
    if (++ij >= MAXJMP) {
        writejmps(id);
        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof (struct jmp) +
        sizeof(offset);
    }
}
dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
dx[id].jp.x[ij] = xx;
dx[id].score = delyfyy;
}
if (xx = lenO && yy < lenI) {
/* last col
*/
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+insl*(len1-yy);
```

145
147

```
        if (coll [yy] > smax) {
            smax = coll[yy];
            dmax = id; }
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+insl*(len0-xx);
if (coll[yy-l] > smax) {
    smax = col1[yy-l];
    dmax = id;
}
tmp = colO; colO = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);      }

/*
*
* print() — only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat() — trace back best path, count matches: print()
* pr_align() — print alignment of described in array p[]: print()
* dumpblock() — dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
* nums() — put out a number line: dumpblock()
* putline() — put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
* stars() - -put a line of stars: dumpblock()
* stripname() — strip any path and prefix from a seqname
*/

#include "nw.h"

#define SPC 3
```

~~146~~
148

```
#define PJLINE          256  /* maximum output line */
#define P_SPC 3         /* space between name or num and seq */
```

```
extern      _day[26][26];
```

```
int  olen;          /* set output line length */
```

```
FILE  *fx;          /* output file */
```

print

```
print ()
```

```
{
```

```
    int 1x, 1y, firstgap, lastgap; /* overlap */
```

```
    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
```

```
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
```

```
        cleanup();
```

```
    }
```

```
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
```

```
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[l], len1);
```

```
    olen = 60;
```

```
    1x = len0;
```

```
    1y = len1;
```

```
    firstgap = lastgap = 0;
```

```
    if (dmax < lenl - 1) { /* leading gap in x */
```

```
        pp[0].spc = firstgap = lenl - dmax - 1;
```

```
        1y -= pp[0].spc;
```

```
    }
```

```
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
```

```
        pp[l].spc = firstgap = dmax - (lenl - 1);
```

```
        1x -= pp[l].spc;
```

```
    }
```

```
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
```

```
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
```

```
        1x -= lastgap;
```

```
    }
```

```
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
```

```
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
```

```
        1y -= lastgap;
```

```

    }
    getmat(lx, 1y, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

```

/*
*trace back the best path, count matches
*/

```

static

getmat(1x, 1y, firstgap, lastgap)

getmat

```

    int    1x, 1y;          /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int          nm, i0, il, siz0, sizl;
    char          outx[32];
    double        pet;
    register      n0, n1;
    register char  *p0, *p1;

    /* get total matches, score
    */
    i0 = il = siz0 = sizl = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[l].spc;
    pi = seqxfi + pp[0].spc;
    n0 = pp[l].spc + 1;
    n1 = pp[0]. spc + 1;

    nm = 0;
    while (*p0 && *p1) {
        if (siz()) {
            pl++;
            nl++;
            siz0--;
        }
    }
}

```

~~148~~
150

```
        else if (sizl) {
            p0++;
            n0++;
            sizl--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*pl-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[l].x[i1])
                sizl = pp[l].n[i1++]; p0++; pl++;
        }
    }

    /*pct homology:
    * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
    * else, knock off overhangs and take shorter core
    */
    if (endgaps)
        1x = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        1x = (1x < 1y)? 1x : 1y;
    pct = 100.*(double)nm/(double)1x;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", 1x, pct);

    fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
...getmat
    if (gapx) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
```

149
151

```

if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d
        per base)\n", smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINSI);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per
        residue)\n", smax, PINSO, PINSI);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized, left endgap: %d %s%s, right endgap: %d
        %s%s\n", firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

```

```

static      nm;          /* matches in core — for checking */
static      1max;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number — for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P-LINE]; /* set by stars() */

```

```

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */

```

152

static

pr_align()

pr_align

{

int nn; /*char count*/

int more;

register i;

for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {

nn = stripname(namex[i]);

if (nn > lmax)

lmax = nn;

nc[i] = 1;

ni[i] = 1;

siz[i] = ij[i] = 0;

ps[i] = seqx[i];

po[i] = out[i]; }

for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {

...**pr_align**

for (i = more = 0; i < 2; i++) {

/*

* do we have more of this sequence?

*/

if (!*ps[i])

continue;

more++;

if (pp[i].spc) { /* leading space */

*po[i]++ = ";

pp[i].spc--;

}

else if (siz[i]) { /* in a gap */

*po[i]++ = '-';

siz[i]-;

}

```

else {      /* we're putting a seq element
            */
    *po[i] = *ps[i];
    if (islower(*ps[i]))
        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
    po[i]++;
    ps[i]++;

    /*
    *are we at next gap for this seq?
    */
    if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
        /*
        * we need to merge all gaps
        * at this location
        */
        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
            siz[i] += pp[i].n[ij[i]++] ;
    }
    ni[i]++;
}

}

if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
    nn = 0; }

}

}

/*
* dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
*/
static

```

152
154

dumpblock()

dumpblock

{

register i;

for (i = 0; i < 2; i++)

 *po[i] = '\0';

...dumpblock

 (void) putc('\n', fx);

for (i = 0; i < 2; i++) {

if (*out[i] && (*out[i] != " || *(po[i]) != ' ')) {

if(i = 0)

 nums(i);

if(i==0&&*out[l])

 stars();

 putline(i);

if(i = 0&&*out[l])

 fprintf(fx, star);

if(i=1)

 nums(i);

 }

 }

}

/*

*put out a number line: dumpblock()

*/

static

nums(ix)

nums

int ix; /* index in out[] holding seq line */

{

char nline[P_LINE];

register i,j;

register char *pn, *px, *py;

153
155

```
for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
    *pn = ' ';
for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
    if (*py = " || *py == '-')
        *pn = " ;
    else {
        if (i%10 == 0 || (i = 1 && nc[ix] != 1)) {
            j = (i < 0)? -i : i;
            for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                *px = j%10 + '0';
            if (i < 0)
                *px = '-';
        }
        else
            *pn = " ;
        i++;
    }
}
*pn = '\0';
nc[ix] = i;
for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void) putc(*pn, fx);
(void) putc('\n', fx);
}
```

```
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
```

static

putline(ix)

```
int ix;          {
```

```
int              i;
```

```
register char     *px;
```

putline

...putline

156

```
for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) puto("\n", fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[l]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    stars
    {
        int i;
        register char *p0, *p1, ex, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == " && *(po[0]) == ' ' ||
            !*out[l] || (*out[l] == " && *(po[l]) == ' '))
            return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
            *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[l]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
            if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                    cx = '*';
                }
            }
        }
    }
}
```

18
15?

```
nm++;  
}  
else if (!dna && _day[*pO-'A'][*pI-'A'] > 0)  
    cx = '.';  
else  
    cx = " "  
}  
else  
    cx = ' ';  
    *px++ = ex;  
}  
*px++ = '\n';  
*px = '\0';  
}
```

```
/*  
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()  
 */
```

static

stripname

```
stripname (pn)  
    char *pn; /* file name (may be path) */  
{  
    register char *px, *py;  
  
    py = 0;  
    for (px = pn; *px; px++)  
        if (*px == '\\')  
            py = px + 1;  
    if (py)  
        (void) strcpy(pn, py);  
    return(strlen(pn));  
}  
/*
```

156
158

```
* cleanup() — cleanup any tmp file
* getseq() — read in seq, set dna, len, maxlen
* g_calloc() — calloc() with error checkin
* readjumps() — get the good jumps, from tmp file if necessary
* writejumps() — write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
*/
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char      *jname = "/tmp/homgXXXXXX";      /* tmp file for jumps */
FILE      *fj;

int        cleanup();                      /* cleanup tmp file */
long       lseek();

/*
* remove any tmp file if we blow
*/
cleanup(i)                                cleanup
    int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
* read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
* skip lines starting with ';', '<', or '>'
* seq in upper or lower case
*/
char *
getseq(file, len)                        getseq
    char      *file;      /* file name */
    int       *len;       /* seq len */
{
```

```

char          line[1024], *pseq;
register char          *px, *py;
int           natgc, tlen;
FILE          *fp;

if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
    fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
    exit(1);
}
tlen = natgc = 0;
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++)
        if (isupper(*px) || islower(*px))
            tlen++;
}
if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
    fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog,
    tlen+6, file);
    exit(1);
}
pseq[0] = pseqfl = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;

```

178
[60

```
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU",*(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)
    g_calloc
    char *msg;          /* program, calling routine */
    int  nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char      *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n",
                prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
    readjmps
```

{

int fd = -1;

int siz, i0, il;

register i, j, xx;

if (fj) {

(void) fclose(fj);

if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {

fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);

cleanup(l);

}

}

for (i = i0 = i1 = 0, dmax() = dmax, xx = len(); ; i++) {

while (1) {

for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--);

...readjmps

if (j < 0 SLSC dxfdmax]. offset SLSL fj) {

(void) lseek(fd, dx[dmax]. offset, 0);

(void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));

(void) read(fd, (char *)&dx[dmax]. offset, sizeof(dx[dmax]. offset));

dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;

}

else

break;

}

if (i >= JMPS) {

fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);

cleanup(l);

}

if (j >= 0) {

siz = dx[dmax].jp.n[j];

xx = dx[dmax].jp.x[j];

dmax += siz;

1/60
162

```
        if (siz < 0) {          /* gap in second seq */
            pp[l].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + lenl - 1
            */
            pp[l].x[i1] = xx - dmax + lenl - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
    }
    else
        break;
}

/* reverse the order of jmps
*/
for (j = 0, i0~; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < il; j++, il--) {
    i = pp[l].n[j]; pp[l].n[j] = pp[l].n[i1]; pp[l].n[i1] = i;
    i = pp[l].x[j]; pp[l].x[j] = pp[l].x[i1]; pp[l].x[i1] = i;
}
```

```
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
    }
}

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                writejmps
    int          ix;
{
    char          *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(l);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(l);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

El término “vector”, como se emplea en la presente, tiene la finalidad de hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se enlazó. Un tipo de vector es un “plásmido” que hace referencia a una vuelta circular de ADN de dos hélices al cual se pueden ligar unos segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector viral donde adicionalmente los segmentos de ADN se pueden ligar al genoma viral. Ciertos vectores tienen la capacidad de replicarse

de forma autónoma en una célula anfitriona a la cual son introducidos (por ejemplo, los vectores bacterianos cuyo origen de replicación es bacteriano y los vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no-episomales de mamíferos) se pueden integrar al genoma de una célula anfitriona cuando se introducen en la célula anfitriona y en esta forma se replican junto con el genoma anfitrión. Adicionalmente, ciertos vectores tienen la capacidad de dirigir la expresión de los genes a los cuales se han enlazado operativamente. En la presente se hace referencia a estos vectores como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión con utilidad en las técnicas de ADN recombinante con frecuencia se encuentran en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se pueden intercambiar puesto que el plásmido es la forma de vector empleada de manera más común.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico" como se emplean en forma intercambiable en la presente, hacen referencia a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser deoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, como nucleótidos metilados y sus análogos. Si se encuentra presente, la modificación de la estructura del nucleótido se puede impartir antes o después de la conformación del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no-nucleótidos. Un polinucleótido se puede modificar posteriormente después de la síntesis, como mediante la conjugación con una marcación. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caps", sustitución de uno o varios nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidas como por ejemplo, aquellos con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen fracciones pendientes, como por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, peptidas de señal, pli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boron, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), al igual que la forma sin modificar del (los)

polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares se puede reemplazar, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos de protección estándar, o activados para preparar unos enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o se pueden conjugar con soportes sólidos o semi-sólidos. Los terminales OH 5' y 3' pueden ser fosforilados o sustituidos con aminas o con fracciones orgánicas del grupo de revestimiento de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivar a unos grupos de protección estándar. Los polinucleótidos también pueden contener una forma análoga de azúcares de ribosa o deoxiribosa generalmente conocidos en el arte, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa anoméricos, azúcares epiméricos como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosa, análogos acíclicos y análogos abásicos de nucleosida como metilribosida. Se puede reemplazar uno o varios enlaces de fosfodiéster con unos grupos de enlace alternos. Estos grupos alternos de enlace incluyen, pero no se limitan a, incorporaciones donde el fosfato se reemplaza por P(O)S("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), donde cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o sin sustituir (1-20 C) opcionalmente conteniendo un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La anterior descripción aplica a todos los polinucleótidos citados en la presente, incluyendo ARN y DNA.

"Oligonucleótido", como se emplea en la presente, generalmente hace referencia a polinucleótidos cortos, generalmente de una sola hélice, generalmente sintéticos que tienen generalmente, pero no necesariamente, menos de alrededor de 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La anterior descripción de los polinucleótidos es total e igualmente aplicable para los oligonucleótidos.

El término "factor de crecimiento hepatocítico" o "FCH" como se emplea en la presente, hace referencia, salvo si específicamente o contextualmente se indica en contrario, a cualquier polipéptida FCH natural o variante (ya sea natural o sintética) que es capaz de activar la vía de señalización FCH/c-met bajo condiciones que permiten que este proceso se lleve a cabo. El término "HGF de tipo natural" generalmente hace referencia a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína FCH natural. El término "secuencia

FCH de tipo natural" generalmente hace referencia a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en el FCH natural.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se emplean en forma intercambiable en el sentido más amplio, e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se describe en mayor detalle en la presente). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

"Fragmentos de anticuerpos" comprenden únicamente una porción de un anticuerpo intacto, donde la porción preferiblemente retiene por lo menos uno, preferiblemente la mayoría o la totalidad de las funciones normalmente asociadas a la citada porción cuando se encuentra presente en un anticuerpo intacto. En una incorporación, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión de un antígeno del anticuerpo intacto, y por lo tanto retiene la habilidad de unir el antígeno. En otra incorporación, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, retiene por lo menos una de las funciones biológicas normalmente asociada a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, como la unión FcRn, la modulación de la vida media del anticuerpo, la función ADCC y la unión complementaria. En una incorporación, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media *in vivo* sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, el citado fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión de antígeno enlazado a una secuencia Fc capaz de conferir una estabilidad *in vivo* al fragmento. En una incorporación, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de un brazo como se describe en WO2005/063816. En una incorporación, el anticuerpo de un brazo comprende mutaciones Fc que constituyen "prominencias" y "orificios" como se describe en WO2005/063816. Por ejemplo, una mutación de orificio puede ser uno o varios de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido Fc y una mutación de cavidad puede ser T366W.

El término "anticuerpo monoclonal" como se emplea en la presente hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por unas mutaciones que pueden ocurrir en la naturaleza y que pueden estar presentes en cantidades menores.

Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen hacia un solo antígeno. Adicionalmente, en contraste con preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos hacia diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige hacia un solo determinante en el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales en la presente específicamente incluyen anticuerpos "quiméricos" en los cuales una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie en particular, o perteneciendo a una clase o sub-clase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es (son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o perteneciendo a otra clase o sub-clase de anticuerpo, al igual que fragmentos de los citados anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4,816,567; y Morrison y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81:6851-6855 (1984)).

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no-humana. Casi siempre, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo aceptor) donde los residuos de una región hipervariable del aceptor se reemplazan con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de soporte (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos no-humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo aceptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar aún más el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado sustancialmente va a comprender todos de por lo menos uno y típicamente dos dominios variables, donde todas o sustancialmente todas las vueltas hipervariables corresponden a aquellas de la inmunoglobulina no-humana y donde todos o sustancialmente todos los FRs son aquellos de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también va a comprender por lo menos una porción de una inmunoglobulina de región constante (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para mayores detalles, consultar Jones y

colaboradores, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y colaboradores, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Consultar también los siguientes artículos de revisión y las referencias citadas en los mismos: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al cual se puede unir un anticuerpo en forma selectiva. El antígeno objetivo puede ser una polipéptida, un carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético. Preferiblemente, el antígeno objetivo es una polipéptida. Un "soporte humano aceptor" para los fines de la presente, es un soporte que comprende la secuencia de aminoácidos de un soporte VL o VH derivado de un soporte de inmunoglobulina humana o de un soporte consensual humano. Un soporte humano aceptor "derivado de" un soporte de inmunoglobulina humana o de un soporte consensual humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de este, o puede contener unos cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. Cuando se encuentran presentes los cambios preexistentes del aminoácido, preferiblemente no se encuentran presentes más de 5 y preferiblemente 4 o menos, o 3 o menos cambios preexistentes de aminoácidos en un VH; preferiblemente estos cambios son solamente en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en estas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una incorporación, el soporte humano aceptor VL tiene una secuencia idéntica a la secuencia de soporte humano de inmunoglobulina VL o a la secuencia de soporte consensual humano.

Un "soporte consensual humano" es un soporte que representa el residuo de aminoácidos más común en una selección de inmunoglobulina humana VL o en secuencias de soporte VH. Generalmente, la selección de la inmunoglobulina humana VL o las secuencias VH se toman de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y colaboradores. En una incorporación, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y colaboradores. En una incorporación, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y colaboradores.

Un "soporte consensual VH subgrupo III" comprende la secuencia consensual obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III variable pesado de Kabat y colaboradores. En una incorporación, la secuencia de soporte

consensual de aminoácidos VH subgrupo III comprende por lo menos una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:43)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:44)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45).

Un "soporte consensual VL subgrupo I" comprende la secuencia consensual obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa variable liviana de Kabat y colaboradores. En una incorporación, la secuencia de soporte consensual de aminoácidos VH subgrupo I comprende por lo menos una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:48)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:49).

Un "soporte humano sin modificar" es un soporte humano que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el soporte humano aceptor, por ejemplo carece de sustitución(es) de aminoácidos humano a no-humano en el soporte humano aceptor.

Una "región hipervariable alterada" para los efectos de la presente, es una región hipervariable que comprende uno o varios (por ejemplo uno hasta alrededor de 16) sustitución(es) de aminoácidos en la misma.

Una "región hipervariable sin modificar" para los efectos de la presente, es una región hipervariable que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no-humano del cual se derivó, es decir uno que carece de una o varias sustituciones de aminoácidos en el mismo.

El término "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se emplea en la presente, hace referencia a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman unas vueltas estructuralmente definidas. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Un número de delineaciones de región hipervariable se encuentran en uso y se encuentran abarcadas en la presente. Las Regiones de Determinación Complementaria de Kabat (CDRs) se basan en la variabilidad de la secuencia y son las que se emplean con más frecuencia (Kabat y colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Edición 5, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Sin embargo, Chothia hace referencia a la ubicación de las vueltas estructurales (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917

(1987)). Las regiones hipervariables AbM representan un compromiso entre los CDRs de Kabat y las vueltas estructurales de Chothia y son empleados por el software de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de “contacto” se basan en un análisis de las complejas estructuras de cristal disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se anotan abajo.

Vuelta	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
----	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables extendidas” como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93- 102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos del dominio variable están enumerados de acuerdo con Kabat y colaboradores, *supra* para cada una de estas definiciones.

Residuos de “soporte” o “FR” son aquellos residuos de dominio variable diferentes a los residuos de región hipervariable como se definen en la presente.

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que se ha manufacturado empleando cualquiera de las técnicas para manufacturar anticuerpos humanos como se divulga en la presente. Esta definición de anticuerpo humano específicamente excluye un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión de antígeno no-humano.

Un anticuerpo de “afinidad madurada” es uno con una o varias alteraciones en uno o en varios CDRs del mismo que resultan en un mejoramiento de la afinidad del anticuerpo para el antígeno, cuando se compara con un anticuerpo progenitor que no posee esta(s) alteración(es). Los anticuerpos de afinidad madurada preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para

el antígeno objetivo. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en el arte. Marks y colaboradores *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración de afinidad como la combinación de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o de residuos de soporte se describe por Barbas y colaboradores, *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier y colaboradores *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton y colaboradores, *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson y colaboradores, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que fija. Los anticuerpos de bloqueo preferidos o los anticuerpos antagonistas sustancialmente o completamente inhiben la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista", como se emplea en la presente, es un anticuerpo que imita por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Un "desorden" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Estos incluyen desórdenes crónicos y agudos o enfermedades incluyendo aquellas condiciones patológicas que predisponen el mamífero al desorden en cuestión. Ejemplos no limitantes de los desórdenes a ser tratados en la presente incluyen tumores malignos y benignos; neoplasias no relacionadas con leucemia y linfoides; desórdenes neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicas y otros desórdenes glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales y blastocóelicos; y desórdenes inflamatorios, inmunológicos y otros desórdenes relacionados con la angiogénesis.

Los términos "desorden de proliferación celular" y "desorden proliferativo" hacen referencia a desórdenes asociados con determinado grado de proliferación celular anormal. En una incorporación, el desorden de proliferación celular es cáncer.

"Tumor", como se emplea en la presente, hace referencia a todo el crecimiento y la proliferación neoplásica de las células, bien sea maligna o benigna, a todas las células y a todos los tejidos pre-cancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "desorden de proliferación celular", "desorden proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes, como se hace referencia a los mismos en la presente.

Los términos “cáncer” y “canceroso” hacen referencia a o describen la condición fisiológica de los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento/una proliferación celular irregular. Ejemplos de cáncer incluyen pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen carcinoma escamoso, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma no microcítico de pulmón, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

La desregulación de la angiogénesis puede conducir a muchos desórdenes que pueden ser tratados mediante composiciones y métodos de la invención. Estos desórdenes incluyen condiciones neoplásicas y no neoplásicas. Las neoplasias incluyen pero no se limitan a aquellas descritas arriba. Los desórdenes no neoplásicos incluyen pero no se limitan a una hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoidea (RA), psoriasis, placas psoriásicas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas; retinopatías diabéticas y otras retinopatías incluyendo retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de cornea, neovascularización por injerto de cornea, rechazo de injerto de cornea, neovascularización retinal/coroidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroides (incluyendo la enfermedad de Graves-Basedow), trasplante de cornea y de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión aguda de pulmón/ARDS, sepsis, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pleurales malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado con isquemia aguda / traumatismo craneoencefálico cerrado / trauma), inflamación sinuial, formación de paño sinuial en RA, osificación heterotópica, formación hipertrópica de hueso, osteoartritis (OA), ascitis resistentes, enfermedad ovárica poliquística, endometriosis, 3er espacio de enfermedades de líquidos (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), fibroides uterinos, trabajo de parto prematuro, inflamación crónica como IBD

(Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrótico, crecimiento de masa de tejido no deseado o aberrante (no- cáncer), artropía hemofílica, cicatrices hipertróficas, inhibición de crecimiento de vello, síndrome Osler-Weber, granuloma piógeno, fibroplasias retrolenticulares, esclerodermia, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico (como el asociado a la pericarditis) y derrame pleural.

Como se emplea en la presente, "tratamiento" hace referencia a una intervención clínica con el objeto de alterar el curso natural del individuo o de la célula que se está tratando, y se puede efectuar ya sea para la profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, reducir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o tratar en forma paliativa el estado de la enfermedad y la remisión o un mejor pronóstico. En algunas incorporaciones, los anticuerpos de la invención se emplean para retardar el progreso de una enfermedad o desorden.

Una "cantidad efectiva" hace referencia a una cantidad efectiva, a unas dosis y durante unos periodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico esperado.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista puede variar de acuerdo con factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la habilidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es igualmente una donde cualquier efecto tóxico o nocivo de la sustancia/molécula, agonista o antagonista es menor que los efectos terapéuticamente benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" hace referencia a una cantidad efectiva, a unas dosis y por unos periodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado profiláctico esperado. Típicamente, pero no necesariamente, puesto que se emplea una dosis profiláctica en individuos antes de o en una etapa inicial de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

El término "agente citotóxico" como se emplea en la presente hace referencia a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término tiene la finalidad de incluir isótopos

radioactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu), quimioagentes terapéuticos por ejemplo metotrexato, adriamicina, vinca alcaloides (vincristina, vinblastina, etoposida), doxorubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes de intercalado, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fungal, de plantas o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos y los diferentes agentes antitumorales y anticancerígenos divulgados abajo. Otros agentes citotóxicos se describen abajo. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células del tumor.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de quimioagentes terapéuticos incluyen agentes alquilantes como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquilsulfonatos como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9- tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo topotecano sintético (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC- 1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de hidrócloruro de mecloretamina, melfalano, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitroúreas como carmustina, clorozotozina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como antibióticos de tipo enodiino (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y calicheamicina omega11 (consultar por ejemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; al igual que neocarcinoestatina cromóforo y cromóforos de antibióticos de tipo enodiino de cromoproteína), aclacinomicinas, actinomicina,

autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICINA® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarabina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti- suprarrenales como aminoglutetimida, mitotano, trilostana; reabastecimiento de ácido fólico como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamidamida glicosida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucida; nitrato de galio; hidroxíurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbicina; PSK® complejo polisacarida (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; riizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; trichotecenos (especialmente T-2 toxina, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbicina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, *por ejemplo*, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.), ABRAXANO™ libre de cremóforo, formulación de micropartículas construidas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); cloranbucil; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatina y carboplatina; vinblastina (VELBAN®); platino; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides como ácido

retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables; al igual que combinaciones de dos o más de los anteriores como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatina (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

Igualmente en esta definición se incluyen los agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden estimular el crecimiento del cáncer, y con frecuencia se encuentran en forma de tratamientos sistémicos o que afectan todo el cuerpo. Estos mismos pueden ser hormonas. Los ejemplos incluyen anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor estrogénico (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifen), EVISTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LYI 17018, onapristona y FARESTON® toremifeno; anti-progesteronas; regulación por disminución del estrógeno receptor (ERDs); agentes que funcionan para suprimir o cerrar los ovarios, por ejemplo, agonistas (LHRH) de la hormona liberadora de la hormona luteinizante como LUPRON® y ELIGARD® acetato de leuprolida, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; otros anti-andrógenos como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales como por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestana, formestania, fadrozole, RIVISOR® vorozole, FEMARA® letrozole y ARIMIDEX® anastrozole. Adicionalmente, dicha definición de quimioagentes terapéuticos incluye bisfosfonatos como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), DIDROCAL® etidronato, NE-58095, ZOMETA® ácido zoledrónico /zoledronato, FOSAMAX® alendronato, AREDIA® pamidronato, SKELID® tiludronato, o ACTONEL® risedronato; al igual que troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolan nucleosida citosina); oligonucleótidos complementarios, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia genética por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; LURTOTECAN® inhibidor de topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; lapatinib ditosilato (un ErbB-2 y EGFR inhibidor dual de molécula pequeña de la

177

tirosina cinasa también conocida como GW572016); y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

Un "agente inhibidor de crecimiento" cuando se emplea en la presente hace referencia a un compuesto o a una composición que inhibe el crecimiento de una célula cuyo crecimiento depende del FCH/la activación c-met bien sea *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor de crecimiento puede ser uno que significativamente reduce el porcentaje de células dependientes del FCH/de la c-met en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores de crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente al de la fase S), como los agentes que inducen la detención G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores topoisomerasa II como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida y bleomicina. Aquellos agentes que detienen el G1 también se trasladan a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracil y ara-C. Se puede encontrar mayor información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drugs" por Murakami y colaboradores (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados ambos del árbol de tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del árbol de tejo europeo es un análogo semi-sintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel estimulan la formación de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos previniendo la despolimerización, que resulta en la inhibición de la mitosis celular.

"Doxorubicina" es un antibiótico antraciclino. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S- cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

Generando anticuerpos variantes que exhiben una reducción o una ausencia de respuesta HAMA

La reducción o eliminación de una respuesta HAMA es un aspecto significativo del desarrollo clínico de agentes terapéuticos apropiados. Consultar por ejemplo, Khaxzaeli y colaboradores, J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers y colaboradores, Transplantation (1986), 41:572; Shawler y colaboradores, J. Immunol. (1985), 135: 1530; Sears y colaboradores, J. Biol. Response Mod.

176
[78]

(1984), 3: 138; Miller y colaboradores, Blood (1983), 62:988; Hakimi y colaboradores, J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann y colaboradores, Nature (1988), 332:323; Junghans y colaboradores, Cancer Res. (1990), 50: 1495. Como se describe en la presente, la invención dispone unos anticuerpos que son humanizados de manera que la respuesta HAMA se reduce o elimina. Las variantes de estos anticuerpos se pueden obtener adicionalmente empleando unos métodos de rutina conocidos en el arte, algunos de los cuales se describen en más detalle abajo.

Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo como se describe en la presente puede servir como una secuencia de partida (progenitora) para la diversificación del soporte y/o la(s) secuencia(s) hipervariable(s). En la presente se hace referencia a una secuencia de soporte seleccionada a la cual se fija una secuencia hipervariable de partida, como un soporte humano aceptor. Mientras los soportes humanos aceptores pueden ser o se pueden derivar de una inmunoglobulina humana (las regiones VL y/o VH de los mismos), preferiblemente los soportes humanos aceptores provienen o se derivan de una secuencia de soporte humano consensual como que se ha demostrado que estos soportes tienen una inmunogenicidad mínima o inexistente en los pacientes humanos.

Cuando el aceptor se deriva de una inmunoglobulina humana, opcionalmente se puede seleccionar una secuencia de soporte humano que se selecciona con base en su homología con la secuencia del donante alineando la secuencia de soporte del donante con varias secuencias de soporte humano en un conjunto de secuencias de soporte humano y seleccionar la secuencia de soporte más homóloga como el aceptor.

En una incorporación, soportes consensuales humanos en la presente provienen o se derivan de subgrupo VH y/o de secuencias de soporte consensuales VL kappa subgrupo I.

Por lo tanto, el soporte humano aceptor VH puede comprender uno, dos, tres o la totalidad de las siguientes secuencias de soporte:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID No:42),

FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID No:43),

FR3 que comprende FR3 comprende
RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID No:50), donde X1 es A o R, X2 es T o N y X3 es A o L,

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEQ ID No:45).

Ejemplos de soportes consensuales VH incluyen:

177
179

soporte consensual humano VH subgrupo I menos Kabat CDRs (SEQ ID No: 19);
soporte consensual humano VH subgrupo I menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:20- 22);
soporte consensual humano VH subgrupo II menos Kabat CDRs (SEQ ID No:23);
soporte consensual humano VH subgrupo II menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:24-26);
soporte consensual humano VH subgrupo HI menos Kabat CDRs (SEQ ID No:27);
soporte consensual humano VH subgrupo HI menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID No:28-30);
soporte consensual humano aceptor VH menos Kabat CDRs (SEQ ID No:31);
soporte consensual humano aceptor VH menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:32-33);
soporte consensual humano aceptor VH 2 menos Kabat CDRs (SEQ ID No:34); o
soporte consensual humano aceptor VH 2 menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:35-37).

En una incorporación, el soporte humano aceptor VH comprende uno, dos, tres o la totalidad de las siguientes secuencias de soporte:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID No:42),
FR2 que comprende WVRQAPGKGGLEWV (SEQ ID No:43),
FR3 que comprende RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID No:51),
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID No:52),
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID No:53),
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEQ ID No:54), o
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEQ ID No:55)
FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEQ ID No:45).

El soporte humano aceptor VL puede comprender uno, dos, tres o la totalidad de las siguientes secuencias de soporte:

FR1 que comprende DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID No:46),
FR2 que comprende WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID No:47),
FR3 que comprende GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID No:48),
FR4 que comprende FGQGTKVEIK (SEQ ID No:49).

Ejemplos de soportes consensuales VL incluyen:

soporte consensual subgrupo I kappa humano VL(SEQ ID No: 38);
soporte consensual subgrupo II kappa humano VL(SEQ ID NO:39);
soporte consensual humano VL kappa subgrupo III (SEQ ID NO:40); o

h8
100

soporte consensual subgrupo IV kappa humano VL(SEQ ID No:41).

Aunque el aceptor puede tener una secuencia idéntica a la secuencia de soporte humano seleccionada, ya sea en forma de una inmunoglobulina humana o de un soporte consensual humano, la presente invención contempla que la secuencia del aceptor puede comprender sustituciones preexistentes de aminoácidos relativas a la secuencia de la inmunoglobulina humana o a la secuencia de soporte consensual humano. Estas sustituciones preexistentes preferiblemente son mínimas; normalmente cuatro, tres, dos o una diferencia de aminoácido relativas a la secuencia de la inmunoglobulina humana o a la secuencia de soporte consensual.

Los residuos de región hipervariable de un anticuerpo no-humano se incorporan al VL y/o al soporte humano aceptor VHs. Por ejemplo, se podrían incorporar residuos que corresponden a los residuos Kabat CDR, a los residuos de la vuelta hipervariable Chothia, a los residuos Abm y/o a los residuos de contacto. Opcionalmente, se incorporan los residuos de la región hipervariable extendida como sigue,: 24-34 (LI), 50-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35 (HI), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3).

Aunque en la presente se discute la "incorporación" de residuos de la región hipervariable, se apreciará que ello se puede lograr de varias formas, por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos deseada se puede generar mediante la mutación del ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable del ratón de manera que los residuos del soporte de este se cambien a residuos del soporte humano aceptor o mediante la mutación de ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable humano de manera que los residuos del hiperdominio variable se modifiquen a residuos no humanos, o mediante la síntesis del ácido nucleico que codifica la secuencia deseada, etc.

En los ejemplos en la presente, las variantes de la región hipervariable-injertada se generaron mediante la mutagénesis Kunkel del ácido nucleico que codifican las secuencias humanas aceptoras, empleando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel y colaboradores, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Se pueden introducir unos cambios apropiados en el soporte y/o la región hipervariable, empleando técnicas de rutina, para corregir y reestablecer las interacciones apropiadas de región hipervariable-antígeno.

Se puede emplear la representación fago (a la cual también se hace referencia en la presente como la representación fago en algunos contextos) como un método conveniente y rápido para generar y detectar diversos anticuerpos

129
[81

variantes potenciales en una biblioteca generada por una selección aleatoria de la secuencia. Sin embargo, una persona con destreza en el arte conoce otros métodos para fabricar y cribar anticuerpos alterados

La tecnología de representación fago siempre ha sido una herramienta poderosa para generar y seleccionar unas proteínas novedosas que se fijan a un ligando, como un antígeno. Al emplear las técnicas de representación fago es posible generar grandes bibliotecas de variantes de proteínas que se pueden clasificar rápidamente para aquellas secuencias que se unen a una molécula objetivo con gran afinidad. Los ácidos nucleicos que codifican las polipéptidas variantes generalmente se fusionan a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de capa viral, como la proteína de gen III o la proteína de gen VIII. Se han desarrollado los sistemas de representación fago monovalente donde la secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína o la polipéptida se fusiona a una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de la proteína del gen III. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). En un sistema de representación fago monovalente, la fusión del gen se expresa a niveles bajos y las proteínas de gen III de tipo natural también se expresan de manera que se conserva la infectividad de las partículas. Los métodos para generar bibliotecas peptidas y para detectar esas bibliotecas han sido divulgados en muchas patentes (por ejemplo Patente de Estados Unidos No. 5,723,286, Patente de Estados Unidos No. 5,432, 018, Patente de Estados Unidos No. 5,580,717, Patente de Estados Unidos No. 5,427,908 y Patente de Estados Unidos No. 5,498,530).

Las bibliotecas de los anticuerpos o las polipéptidas que se unen al antígeno se han preparado de múltiples formas incluyendo mediante la alteración de un solo gen insertando unas secuencias aleatorias de ADN o mediante la clonación de una familia de genes relacionados. Los métodos para representar los anticuerpos o los fragmentos que fijan el antígeno empleando una representación fago han sido descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108, 6,172,197, 5,580,717 y 5,658,727. Luego se efectúa una clasificación sistemática de la biblioteca para encontrar la expresión de los anticuerpos o las proteínas que fijan el antígeno con las características deseadas.

Los métodos para sustituir un aminoácido determinado en un modelo de ácido nucleico se encuentran bien establecidos en el arte, y algunos de estos se describen en la presente. Por ejemplo, los residuos de región hipervariable se

~~180~~
182

pueden sustituir empleando el método Kunkel. Consultar por ejemplo, Kunkel y colaboradores, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o varios de los conjuntos de codones designados para los residuos de región hipervariable que se van a alterar. Un conjunto de codones es un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos empleados para codificar la variante deseada de aminoácidos. Los conjuntos de codones se pueden representar empleando unos símbolos para designar unos nucleótidos en particular, o unas mezclas equimolares de nucleótidos como se muestra abajo, de acuerdo con el código IUB.

CÓDIGOS IUB

G Guanina

A Adenina

T Timina

C Citosina

R (A o G)

Y (C o T)

M (A o C)

K (G o T)

S (C o G)

W (A o T)

H (A o C o T)

B (C o G o T)

V (A o C o G)

D (A o G o T) H

N (A o C o G o T)

Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D puede ser nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.

Los oligonucleótidos o conjuntos de iniciadores se pueden sintetizar empleando unos métodos estándar. Un conjunto de oligonucleótidos se puede sintetizar, por ejemplo mediante la síntesis de fase sólida, conteniendo secuencias que representan todas las combinaciones posibles de tripletes de nucleótidos dispuestos por los conjuntos de codones y que van a codificar el grupo de aminoácidos deseado. La síntesis de oligonucleótidos con una "degeneración" seleccionada de nucleótidos en ciertas posiciones es bien conocida en el arte.

Dichos conjuntos de nucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones se pueden sintetizar empleando sintetizadores de ácido nucleico comercial (disponibles por ejemplo en Applied Biosystems, Foster City, CA), o se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, en Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados teniendo un conjunto de codones en particular típicamente va a incluir una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codones en la totalidad de la secuencia. Los oligonucleótidos, como se emplean de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación a un modelo de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios de enzimas de restricción para efectos de clonación.

En un método, se pueden crear las secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes a través de la mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es bien conocida en el arte como se describe por Zoller y colaboradores *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987). Brevemente, las secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes se crean mediante la hibridación de un conjunto de oligonucleótidos que codifica el conjunto deseado de codones a un modelo de ADN, donde el modelo es una forma de una sola hebra del plásmido conteniendo un modelo de secuencia de ácido nucleico de región variable. Después de la hibridación, se emplea ADN polimerasa para sintetizar toda una hebra secundaria complementaria del modelo que por lo tanto va a incorporar el oligonucleótido iniciador y va a contener los conjuntos de codones como se dispone en el conjunto de oligonucleótidos.

Generalmente, se emplean los oligonucleótidos de por lo menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son totalmente complementarios con respecto al modelo en cualquiera de los lados de la codificación del(los) nucleótido(s) para la(s) mutación(es). Esto garantiza que el oligonucleótido será hibridizado en forma correcta a la molécula del modelo de ADN de una sola hebra. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente empleando técnicas conocidas en el arte como aquellas descritas por Crea y colaboradores, *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA*, 75:5765 (1978).

El modelo de ADN se genera por todos aquellos vectores que son derivados bien sea de vectores fagos M13 (los vectores M13mpl8 y M13mpl9 disponibles en el comercio son apropiados), o de aquellos vectores que contienen un origen de replicación fago de una sola hebra como lo describen Viera y colaboradores, *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Por lo tanto, el ADN que se va a

mutar puede ser insertado en uno de estos vectores con el fin de generar un modelo de una sola hebra. La producción de un modelo de una sola hebra se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook y colaboradores, arriba.

Para alterar la secuencia natural del ADN, el oligonucleótido se hibridiza al modelo de una sola hebra bajo unas condiciones de hibridación apropiadas. Una enzima de polimerización de ADN, normalmente T7 ADN polimerasa o el fragmento Klenow de ADN polimerasa I, se agrega posteriormente para sintetizar la hebra complementaria del modelo empleando el oligonucleótido como un iniciador de síntesis. Por lo tanto se forma una molécula heterodúplex de manera que una hebra del ADN codifica la forma mutada del gen 1 y la otra hebra (el modelo original) codifica la secuencia natural, sin alteración del gen 1. Luego esta molécula heterodúplex se transforma en una célula anfitriona apropiada, normalmente una procariota como *E. coli* JM101. Después de cultivar las células, se llevan a unas placas con agarosa y se criban empleando un iniciador oligonucleótido radiomarcado con un Fosfato-32 para identificar las colonias de bacterias que contienen el ADN mutado.

El método descrito inmediatamente arriba se puede modificar de manera que se cree una molécula homodúplex, y donde ambas hebras del plásmido contienen la(s) mutación(es). Las modificaciones son como sigue: El oligonucleótido de una sola hebra se hibrida al modelo de una sola hebra como se describe arriba. Una mezcla de tres deoxiribonucleótidos, deoxiriboadenosina (dATP), deoxiriboguanosina (dGTP) y deoxiribotimidina (dTTP), se combina con una tiodeoxiribocitosina modificada llamada dCTP-(aS) (que se puede obtener en Amersham). Esta mezcla se agrega al complejo de modelo-oligonucleótido. Una vez se adiciona el ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una hebra de ADN idéntica al modelo excepto por las bases mutadas. Adicionalmente, esta nueva hebra de ADN va a contener dCTP-(aS) en vez de dCTP, que sirve para protegerla de la digestión por restricción de endonucleasa. Una vez la hebra modelo se une a una enzima de restricción apropiada, la hebra modelo puede digerirse con ExoIII nucleasa o con otra nucleasa apropiada después de la región que tiene el(los) sitio(s) que se van a mutagenizar. Luego se detiene la reacción para dejar una molécula que solamente tiene una sola hebra parcialmente. Luego se forma una molécula homodúplex de ADN completa de dos hebras empleando ADN polimerasa en presencia de los cuatro trifosfatos deoxiribonucleótidos, ATP y ADN ligasa. Esta molécula homodúplex luego se puede transformar en una célula anfitriona apropiada.

Como se indicó previamente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos es suficientemente larga para hibridizar el ácido nucleico modelo y también puede, pero no necesariamente, contiene unos sitios de restricción. El modelo se puede generar por aquellos vectores ya sea derivados de vectores M 13 fagos o por vectores que contienen un origen de replicación fago de una sola hebra como lo describe Viera y colaboradores *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Por lo tanto, el ADN que no va a ser mutado se debe insertar en uno de estos vectores con el fin de generar un modelo de una sola hebra. La producción del modelo de una sola hebra se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook y colaboradores, *supra*.

De acuerdo con otro método, se puede generar una biblioteca suministrando unos conjuntos de oligonucleótidos descendentes o ascendentes, y cada conjunto tiene una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferentes secuencias establecidas por los conjuntos de codones dispuestas en la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos ascendentes y descendentes, junto con un modelo de ácido nucleico de dominio variable se pueden emplear en la reacción de polimerasa en cadena para generar una "biblioteca" de productos PCR. Se puede hacer referencia a los productos PCR como "casetes de ácido nucleico", puesto que se pueden fusionar con otras secuencias de ácido nucleico relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de capa viral y dominios de dimerización empleando unas técnicas de biología molecular establecidas.

La secuencia de los iniciadores PCR incluye uno o varios de los conjuntos de codones designados para las posiciones accesibles al solvente y altamente diversas en una región hipervariable. Como se describe arriba, un conjunto de codones es un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos empleados para codificar unas variantes deseadas de aminoácidos.

Los anticuerpos selectores que satisfacen los criterios deseados se seleccionan mediante unos pasos apropiados de cribado/selección, se pueden aislar y clonar empleando unas técnicas recombinantes estándar.

Vectores, células anfitrionas y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para su posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo fácilmente se aísla y se secuencia empleando unos procedimientos convencionales (por ejemplo, empleando sensores de

oligonucleótidos que tienen la capacidad de fijarse específicamente a los genes que codifican la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula anfitriona que se va a emplear. Generalmente, las células anfitrionas preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente mamífero).

Generando anticuerpos empleando células anfitrionas procariotas:

Construcción de vector

Las secuencias de polinucleótido que codifican los componentes polipéptidas del anticuerpo de la invención se pueden obtener empleando unas técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar a partir de células que producen anticuerpos como las células hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar empleando un sintetizador nucleótido o unas técnicas PCR. Una vez se obtienen, las secuencias que codifican las polipéptidas se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos en anfitriones procariotas. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en el arte se pueden emplear con los fines de la presente invención. La selección de un vector apropiado va a depender esencialmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y en la célula anfitriona específica que se va transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión del polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula anfitriona específica en la cual reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un punto de unión de ribosoma (RBS), una secuencia de señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de transcripción.

En general, se emplean los vectores plásmidos conteniendo el replicón y las secuencias de control que se derivan de especies compatibles con la célula anfitriona en conexión con estos anfitriones. Normalmente el vector carga un sitio de replicación, al igual que las secuencias de marcación que son capaces de efectuar una selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* típicamente se transforma utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por lo tanto dispone unos medios muy fáciles para identificar las células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o fagos también pueden contener, o se pueden modificar para

183
[87]

contener promotores que el organismo microbiano puede emplear para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 empleados para la expresión de unos anticuerpos en particular se describen en detalle en Carter y colaboradores, Patente de Estados Unidos No. 5,648,237.

Adicionalmente, los vectores fagos conteniendo el replicón y las secuencias de control que son compatibles con el microorganismo anfitrión se pueden emplear como vectores de transformación en conexión con estos anfitriones. Por ejemplo, se pueden emplear fagos como λ GEM.TM.-11 para fabricar un vector recombinante que se puede utilizar para transformar unas células anfitrionas susceptibles como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipéptidas. Un promotor es una secuencia reguladora sin traducir ubicada en dirección ascendente (5') con respecto a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas típicamente se clasifican en dos grupos, inducible y constitutivo. Un promotor inducible es un promotor que inicia unos altos niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a unos cambios en las condiciones del cultivo, por ejemplo la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

Un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células anfitrionas potenciales es bien conocido. El promotor seleccionado puede estar operacionalmente enlazado a un cistrón de ADN que codifica la cadena liviana o la cadena pesada removiendo el promotor de la fuente de ADN mediante una digestión de la enzima de restricción de cadena liviana o de cadena pesada retirando el promotor de la fuente de ADN mediante la digestión de la enzima de restricción e insertando la secuencia del promotor aislado en el vector de la invención. Se puede utilizar tanto la secuencia del promotor natural como muchos promotores para dirigir la amplificación y/o la expresión de los genes objetivo. En algunas incorporaciones, se utilizan los promotores heterólogos puesto que generalmente permiten una mayor transcripción y unos rendimientos más altos del gen objetivo expresado cuando se compara con el promotor de polipéptida natural objetivo.

Los promotores apropiados para el uso con anfitrionas procariotas incluyen el promotor PhoA, unos sistemas de promotor β -galactamasa y lactosa, un sistema de promotor triptofano (*trp*) y unos promotores híbridos como el promotor *tac* o el promotor *trc*. Sin embargo, otros promotores funcionales en las bacterias

(como otros promotores bacterianos o fagos conocidos) también son apropiados. Sus secuencias nucleótidas han sido publicadas, permitiendo así que una persona con destreza pueda ligarlos operacionalmente a los cistrones que codifican la cadena liviana y la cadena pesada objetivos (Siebenlist y colaboradores (1980) Cell 20: 269) empleando enlazadores o adaptadores para disponer cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto de la invención, cada cistrón en el vector recombinante comprende un componente de secuencia de señal de secreción que dirige la translocación de las polipéptidas expresadas a través de una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de la polipéptida objetivo que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada para los fines de esta invención debe ser una que se reconoce y procesa (es decir segmentada por una peptidasa de señal) por parte de la célula anfitriona. Para las células anfitrionas procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia de señales naturales a las polipéptidas heterólogas, la secuencia de señal se sustituye con una secuencia de señal procariota seleccionada por ejemplo, entre el grupo conformado por la fosfamidatasa alcalina, penicilinas, lpp, o líderes enterotoxina II estables en el calor (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una incorporación de la invención, las secuencias de señales empleadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señales STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede ocurrir en el citoplasma de la célula anfitriona y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias de señales de secreción en cada cistrón. En este aspecto, la cadena liviana y la cadena pesada de inmunoglobulina se expresan, se pliegan y se conforman para formar unas inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Ciertas cepas anfitrionas (por ejemplo, las cepas *E. coli trxB*⁻) disponen unas condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfidos, permitiendo en esta forma un plegamiento apropiado y la conformación de subunidades de proteínas expresadas. Proba and Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

La presente invención dispone un sistema de expresión donde la proporción cuantitativa de los componentes expresados de la polipéptida se puede modular con el fin de maximizar el rendimiento de los anticuerpos secretados y debidamente constituidos de la invención. Dicha modulación se logra, por lo

menos en parte, mediante la modulación simultánea de las fortalezas traslacionales de los componentes de la polipéptida.

Una técnica para modular la fortaleza traslacional se divulga en Simmons y colaboradores, Patente de Estados Unidos No. 5,840,523. Utiliza variantes de la región de iniciación traslacional (TIR) en un cistrón. Para determinada TIR, se puede crear una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico con un rango de fortalezas traslacionales, disponiendo en esta forma un medio conveniente para ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes TIR se pueden generar mediante técnicas convencionales de mutagénesis que resultan en unos cambios en los codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, aunque se prefieren unos cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o el espaciado de las secuencias Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de señal. Un método para generar una secuencia de señales mutante es la generación de un "banco de codones" al comienzo de la secuencia de codificación que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señal (es decir, los cambios son silenciosos). Estos se pueden lograr cambiando la posición del tercer nucleótido de cada codón. Adicionalmente algunos aminoácidos, como la leucina, la serina y la arginina, tienen múltiples primera y segunda posiciones lo cual puede aumentar la complejidad cuando se está configurando el banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura y colaboradores (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4: 151-158.

Preferiblemente, se genera un conjunto de vectores con un rango de fortalezas TIR para cada cistrón en la presente. Este conjunto limitado dispone una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, al igual que el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo diversas combinaciones de fortalezas TIR. Las fortalezas TIR se pueden determinar al cuantificar el nivel de expresión de un gen reportero como se describe en detalle en Simmons y colaboradores Patente de Estados Unidos No. 5, 840,523. Con base en la comparación de la fuerza traslacional, las TIR individuales deseadas se seleccionan para su combinación en las construcciones del vector de expresión de la invención.

Las células anfitrionas procariotas apropiadas para expresar los anticuerpos de la invención incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, como organismos Gram-negativo o Gram-positivo. Ejemplos de bacterias útiles incluyen Escherichia (por

ejemplo, *E. coli*), Bacilli (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una incorporación, se utilizan células gram-negativas. En una incorporación, se emplean células *E. coli* como anfitrionas para la invención. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Depósito No. 27,325) y derivados de los mismos, incluyendo la cepa 33D3 de genotipo W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac lq lacL8 $\Delta ompT$ ($\Delta nmpc-fepE$) $\Delta degP41$ kan^R* (Patente de Estados Unidos No. 5,639,635). Otras cepas y derivadas de las mismas como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31,608) también son apropiadas. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias citadas arriba con unos genotipos definidos son conocidos en el arte, y se encuentran descritos por ejemplo en Bass y colaboradores, Proteins, 8:309-314 (1990). Generalmente esto es necesario para seleccionar la bacteria apropiada teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* se pueden emplear en forma apropiada como anfitrionas cuando se emplean unos plásmidos muy conocidos como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 para proveer el replicón. Típicamente la célula anfitriona debe secretar unas cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y deseablemente se pueden incorporar unos inhibidores adicionales de proteasa en el cultivo de la célula.

Producción de anticuerpos

Las células anfitrionas se transforman con los vectores de expresión descritos arriba y se cultivan en unos medios con nutrientes modificados según lo indicado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en la célula anfitriona procariota de manera que el ADN sea replicable, bien sea como un elemento extracromosomal o mediante un integrante cromosomal. Dependiendo de la célula anfitriona empleada, la transformación se logra empleando unas técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio generalmente se utiliza para las células bacterianas, que contienen unas barreras célula-pared importantes. Otro método para la transformación emplea

polietilenglicol/DMSO. Sin embargo, la electroporación es otra técnica que se utiliza.

Las células procariotas empleadas para producir las polipéptidas de la invención se cultivan en unos medios conocidos en el arte y apropiados para cultivar las células anfitrionas seleccionadas. Ejemplos de medios apropiados incluyen caldo luria más los suplementos nutricionales necesarios. En algunas incorporaciones, el medio también contiene un agente de selección, el cual se escoge con base en la construcción del vector de expresión, para permitir en forma selectiva, el crecimiento de células procariotas conteniendo el vector de expresión. Por ejemplo, se adiciona ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan el gen resistente a la ampicilina.

Cualquier suplemento necesario, además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico también se pueden incluir a las concentraciones adecuadas y se pueden introducir solas o como una mezcla con otro suplemento o medio como una fuente de complejo de nitrógeno. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o varios agentes de reducción seleccionados entre el grupo conformado por glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitól.

Las células anfitrionas procariotas se cultivan a temperaturas apropiadas. Para el crecimiento de *E. coli* por ejemplo, la temperatura preferida varía desde alrededor de 20°C hasta alrededor de 39°C, más preferiblemente desde alrededor de 25°C hasta alrededor de 37°C, incluso más preferiblemente a alrededor de 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe desde alrededor de 5 hasta alrededor de 9, dependiendo principalmente del organismo anfitrión. Para *E. coli*, el pH es preferiblemente desde alrededor de 6.8 hasta alrededor de 7.4 y más preferiblemente alrededor de 7.0.

Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de la proteína se induce bajo unas condiciones apropiadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se emplean promotores PhoA para controlar la transcripción de las polipéptidas. Por lo tanto, las células anfitrionas transformadas se cultivan en un medio que limita el fosfato para la inducción. Preferiblemente, el medio que limita el fosfato es el medio C.R.A.P (consultar por ejemplo, Simmons y colaboradores, *J. Immunol. Methods* (2002), 263: 133-147). Se puede emplear una variedad de inductores diferentes, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en el arte.

En una incorporación, las polipéptidas expresadas de la presente invención se secretan a y se recuperan del periplasma de las células anfitrionas. La

recuperación de proteína típicamente comprende alterar los microorganismos, generalmente por medios como un choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se alteran las células, los desperdicios de las células o las células enteras se pueden retirar mediante centrifugado o filtración. Luego las proteínas se pueden purificar más, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de resina. Alternativamente, las proteínas se pueden transportar al medio de cultivo y aislar en el mismo. Las células se pueden retirar del cultivo y el supernadante del cultivo se puede filtrar y concentrar para una mayor purificación de las proteínas producidas. Las polipéptidas expresadas se pueden aislar aún más y se pueden identificar mediante unos métodos comúnmente conocidos como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y análisis por electrotransferencia.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se efectúa en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Existen varios procedimientos de gran escala, de lotes de fermentación alimentada para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen una capacidad por lo menos de 1000 litros, preferiblemente alrededor de 1,000 hasta 100,000 litros de capacidad. Estos fermentadores emplean unos rotores de agitación para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente la glucosa (fuente preferida de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala generalmente hace referencia a la fermentación en un fermentador cuya capacidad volumétrica no es mayor a 100 litros y puede variar desde alrededor de 1 litro hasta alrededor de 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de la proteína se inicia típicamente después de que las células han crecido bajo condiciones adecuadas hasta alcanzar una densidad deseada, por ejemplo, una OD_{550} de alrededor de 180-220, y en esta etapa las células se encuentran en la fase estacionaria inicial. Se puede emplear una variedad de inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en el arte y como se describe arriba. Las células se pueden cultivar por un periodo más corto antes de la inducción. Normalmente las células se inducen durante alrededor de 12-50 horas, aunque se pueden emplear unos periodos de inducción más largos o más cortos.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de las polipéptidas de la invención, se pueden modificar varias condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar la formación y el plegado correctos de las polipéptidas secretadas del anticuerpo, se pueden emplear unos vectores adicionales

hiperexpresando las proteínas chaperonas, como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células anfitrionas procariotas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad adecuados de las proteínas heterólogas producidas en las células anfitrionas bacterianas. Chen y colaboradores (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou y colaboradores, Patente de Estados Unidos No. 6,083,715; Georgiou y colaboradores, Patente de Estados Unidos No. 6,027,888; Bothmann and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie y colaboradores (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas proteolíticamente sensibles), se pueden emplear ciertas cepas anfitrionas con deficiencia de enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células anfitrionas se pueden modificar para efectuar una(s) mutación(es) genética(s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas como Proteasa HI, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, ProteasaVI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas *E. coli* con deficiencia de proteasa se encuentran disponibles y se describen en por ejemplo, Joly y colaboradores (1998), *supra*; Georgiou y colaboradores, Patente de Estados Unidos No. 5,264,365; Georgiou y colaboradores, Patente de Estados Unidos No. 5,508,192; Hara y colaboradores, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En una incorporación, se utilizan las cepas *E. coli* con deficiencia de enzimas proteolíticas y transformadas con plásmido hiperexpresando una o varias proteínas chaperonas como células anfitrionas en el sistema de expresión de la invención.

Purificación del anticuerpo

En una incorporación, la proteína del anticuerpo producida en la presente se purifica aún más para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para otros análisis y usos. Se pueden emplear unos métodos de purificación de proteína estándar conocidos en el arte. Los siguientes procedimientos son ejemplos de unos procedimientos de purificación: fraccionamiento en inmunoafinidad o columnas de intercambio de iones, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en resina de intercambio de cationes como DEAE, determinación del objetivo principal

mediante cromatografía, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración mediante gel, empleando por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se utiliza la proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación por inmutafinidad de los productos de toda la longitud del anticuerpo de la invención. La proteína A es una proteína 41kD de pared de célula de *Staphylococcus aureus* la cual se une con una alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark y colaboradores, (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida a la cual se inmoviliza la Proteína A es preferiblemente una columna que comprende una superficie en vidrio o sílice, más preferiblemente una columna en vidrio de poros controlados o una columna de ácido sílico. En algunas aplicaciones, la columna se recubrió con un reactivo, como el glicerol, para tratar de evitar la adhesión no específica de contaminantes.

Como el primer paso de la purificación, la preparación derivada del cultivo de la célula, como se describe arriba, se aplica a la Proteína A inmovilizada de fase sólida para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la Proteína A. Luego la fase sólida se lava para extraer los contaminantes no específicos unidos a la fase sólida. Finalmente se recupera el anticuerpo de interés de la fase sólida mediante levigado.

Generando anticuerpos empleando células anfitrionas eucariotas:

Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o varios de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o varios genes de marcación, un elemento intensificador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción.

(i) Componente de secuencia de señal

Un vector para el uso en una célula anfitriona eucariota también puede contener una secuencia de señal u otra polipéptida con un sitio de segmentación específico en el terminal N- de la proteína madura o de la polipéptida de interés. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que se reconoce y procesa (*es decir*, segmentada por una señal peptidasa) por parte de la célula anfitriona. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias de señales de mamíferos, al igual que los líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal del herpes simplex gD, están disponibles.

El ADN para la citada región precursora está ligado en el soporte de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

Generalmente, no se requiere un componente de origen de replicación para los vectores de expresión de los mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 se puede emplear típicamente solo porque contiene el promotor temprano.

(iii) *Componente del gen de selección*

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. La selección típica de los genes codifica unas proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos o a otras toxinas, *por ejemplo*, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, cuando corresponda o (c) suministran los nutrientes críticos no disponibles en un medio complejo.

Un ejemplo de un esquema de selección emplea un fármaco para detener el crecimiento de una célula anfitriona. Aquellas células que se transformaron exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere una resistencia al fármaco y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de la citada selección dominante emplean los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de unos marcadores seleccionables apropiados para las células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber el ácido nucleico del anticuerpo, como DHFR, timidina cinasa, metalotioneina-I y -II, preferiblemente genes metalotioneina primates, adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, *etc.*

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero al cultivar todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula anfitriona apropiada cuando se emplea el tipo natural DHFR es ovario de hámster chino (CHO) estirpe celular deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Alternativamente, se pueden seleccionar células anfitrionas (particularmente las anfitrionas naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína tipo natural DHFR y otro marcador seleccionable como aminoglicosida 3'-fosfotransferasa (APH) mediante el crecimiento celular en un medio conteniendo un agente de selección para el marcador seleccionable como un antibiótico aminoglicosídico, *por ejemplo*, canamicina, neomicina o G418. Consultar Patente de Estados Unidos No. 4,965,199.

(iv) *Componente de promotor*

Normalmente los vectores de expresión y clonación contienen un promotor reconocido por el organismo anfitrión y se enlazan operacionalmente al ácido nucleico del anticuerpo polipéptida. Las secuencias de promotor se conocen por eucariotas. Virtualmente, los genes aleucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en sentido ascendente desde el sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontró de 70 a 80 bases en sentido ascendente desde el inicio de la transcripción de muchos genes en una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas, se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias se insertan de forma apropiada en los vectores de expresión eucariotas.

La transcripción del anticuerpo polipéptida desde los vectores en células anfitrionas de mamíferos se controla, por ejemplo, por medio de unos promotores obtenidos de los genomas de virus como polioma virus, virus de viruela aviar, adenovirus (como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis-B y virus simio 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, *por ejemplo*, el promotor actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque de calor, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula anfitriona.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen viral de replicación SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar el ADN en anfitriones de mamíferos empleando el virus de papiloma bovino como un vector se divulga en la Patente de Estados Unidos No. 4,419,446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4,601,978. Consultar también Reyes y colaboradores, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión de cADN de β -interferona humana en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus herpes simplex. Alternativamente, se pueden emplear las repeticiones del terminal largo del virus Rous Sarcoma como promotor.

(v) Componente del elemento intensificador

La transcripción de ADN que codifica el anticuerpo polipéptida de esta invención mediante unas eucariotas más altas, con frecuencia se aumenta al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas

10/10
19x

secuencias intensificadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente emplearíamos un intensificador de una célula eucariota virus. Ejemplos incluyen el intensificador SV40 en la parte tardía del origen de replicación (bp 100-270), el intensificador del promotor citomegalovirus temprano, el intensificador poliovirus en el lado tardío del origen de replicación e intensificadores de adenovirus. Consultar también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos intensificadores para la activación de promotores eucariotas. El intensificador se puede cortar y empalmar en el vector a una posición 5' o 3' al anticuerpo polipéptido que codifica la secuencia, pero preferiblemente se sitúa en el sitio 5' del promotor.

(vi) Componente de terminación de transcripción

Los vectores de expresión empleados en las células anfitrionas eucariotas típicamente también van a contener las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del mRNA. Dichas secuencias están comúnmente disponibles en las regiones sin traducir 5' y ocasionalmente 3', de ADN o cADN eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótido transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del mRNA que codifican un anticuerpo. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de la hormona de crecimiento bovina de poliadenilación. Consultar WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en la presente.

(vii) Selección y transformación de células anfitrionas

Unas células anfitrionas apropiadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores en la presente incluyen células eucariotas mayores descritas en la presente, incluyendo células anfitrionas de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de estirpes de células anfitrionas útiles son la estirpe CVI de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); estirpe de riñón de embrión humano (293 o células subclonadas 293 para crecimiento en un cultivo de suspensión, Graham y colaboradores, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino /- DHFR (CHO, Urlaub y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:4216 (1980)); células de ratón Sertoli (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CVI ATCC CCL 70); células de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34);

células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (*Mather y colaboradores, Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una estirpe de hepatoma humano (Hep G2).

Las células anfitrionas se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos arriba o mediante los vectores de clonación para la producción de anticuerpos y se cultivan en un medio de cultivo con nutrientes modificados según sea lo apropiado, para inducir promotores, seleccionando transformantes o amplificando los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) *Cultivando las células anfitrionas*

Las células anfitrionas empleadas para producir un anticuerpo de esta invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles en el comercio como F10 de Ham (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Modified Eagle's Medium de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son apropiados para cultivar las células anfitrionas. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos en Ham y *colaboradores, Meth. Enz.* 58:44 (1979), *Barnes y colaboradores, Anal. Biochem* 102:255 (1980), Patentes de Estados Unidos Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de Estados Unidos Re. 30,985 se pueden emplear como un medio de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), soluciones amortiguadoras (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMICINA™), elementos de rastro (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes en las concentraciones finales del rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario a las concentraciones apropiadas que sería conocido por aquellos con destreza en el arte. Las condiciones del cultivo, como la temperatura, el pH y similares son aquellas empleadas previamente con la célula anfitriona seleccionada para la expresión y serán aparentes para un artesano con destreza ordinaria en el arte.

(ix) *Purificación del anticuerpo*

Cuando se emplean técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir en forma intracelular, o se puede secretar directamente en el medio. Si el

anticuerpo se produce en forma intracelular, como un primer paso, las partículas de desechos, bien sea células anfitrionas o fragmentos levigados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugado o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los supernadantes de los citados sistemas de expresión generalmente se concentran primero utilizando un filtro de concentración de proteína disponible en el comercio, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa como PMSF en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adquiridos.

La composición del anticuerpo preparado a partir de células se puede purificar mediante por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía por afinidad, y la cromatografía por afinidad es la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de las especies y de los isotipos de cualquier dominio de inmunoglobulina Fc que se encuentra presente en el anticuerpo. Se puede utilizar la proteína A para purificar los anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Landmark y colaboradores, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para la totalidad de los isotipos de ratón y para el $\gamma 3$ humano (Guss y colaboradores, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se fija el ligando de afinidad con mayor frecuencia es agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables como el vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten unas tasas de flujo más altas y unos tiempos de procesamiento más cortos que aquellos que se pueden alcanzar con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3 , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de la proteína como el fraccionamiento en una columna de intercambio de iones, la precipitación con etanol, la HPLC de fase inversa, la cromatografía en sílice, en heparina, la cromatografía en SEPHAROSE™ en una resina de intercambios de aniones o cationes (como una columna de ácido poliaspártico), la determinación del objetivo principal mediante cromatografía, SDS-PAGE y la precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de cualquier paso preliminar de purificación, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a una cromatografía hidrófoba de pH bajo empleando una solución amortiguadora de

198
200

levigado a un pH entre alrededor de 2.5-4.5, preferiblemente efectuada a unas concentraciones bajas de sal (*por ejemplo*, desde alrededor de 0-0.25M de sal).

Análisis de actividad

Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar por sus propiedades físico/químicas y sus funciones biológicas mediante diversos análisis conocidos en el arte.

Las inmunoglobulinas se pueden caracterizar adicionalmente por una serie de análisis incluyendo, pero no limitado al secuenciado del terminal N, el análisis de aminoácidos, la cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño no desnaturizante (HPLC), la espectrometría de masa, la cromatografía de intercambio de iones y la digestión de papaína.

En ciertas incorporaciones de la invención, se analizan las inmunoglobulinas producidas en la presente para conocer su actividad biológica. En algunas incorporaciones, se efectúan pruebas con las inmunoglobulinas de la presente invención para conocer la actividad de unión de su antígeno. Los análisis de unión del antígeno conocidos en el arte y que se pueden emplear en la presente incluyen sin limitación cualquier análisis directo o competitivo empleando técnicas como la técnica de inmunotransferencia, radioinmunoanálisis, ELISA (análisis inmunoabsorbente relacionado con la enzima), inmunoanálisis "sandwich", análisis de inmunoprecipitación, inmunoanálisis fluorescente e inmunoanálisis de proteína A. A continuación se dispone un análisis ilustrativo de unión de antígeno, en la sección de Ejemplos.

En una incorporación, la presente invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones de efector, que lo convierten en un candidato deseado para muchas aplicaciones en las cuales la vida media del anticuerpo *in vivo* es importante, sin embargo ciertas funciones de efector (como complemento y ADCC) son innecesarias o nocivas. En ciertas incorporaciones, se miden las actividades Fc de la inmunoglobulina producida para garantizar que solamente se conservan las propiedades deseadas. Se pueden efectuar los análisis de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden efectuar los análisis de unión del Fc aceptor (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de uniones FcγR (por lo tanto, probablemente carecen de actividad ADCC), pero conservan la habilidad de unión de FcRn. Las células primarias para la ADCC de mediación, las células NK, únicamente expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La

expresión FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Un ejemplo de un análisis in vitro para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,500,362 o 5,821,337. Unas células efectoras útiles para el citado análisis incluyen células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, como el que se divulga en Clynes y colaboradores PNAS (USA) 95:652-656 (1998). También se pueden efectuar los análisis de unión C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de fijar el C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación complementaria, se puede efectuar un análisis CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro y colaboradores, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). La unión FcRn y las determinaciones de depuración/vida media también se pueden realizar mediante unos métodos conocidos en el arte, por ejemplo aquellos descritos en la sección de Ejemplos.

Anticuerpos humanizados

La presente invención abarca anticuerpos humanizados. En el arte se conocen varios métodos para humanizar anticuerpos no-humanos. Por ejemplo, en un anticuerpo humanizado se puede haber introducido uno o varios residuos de aminoácidos desde una fuente no humana. Con frecuencia se hace referencia a estos residuos no humanos de aminoácidos como residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". Esencialmente se puede llevar a cabo la humanización siguiendo el método de Winter y colegas (Jones y colaboradores, (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann y colaboradores (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen y colaboradores (1988) *Science* 239: 1534-1536), sustituyendo secuencias de región hipervariable con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por lo tanto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4,816,567) donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

200
202

La elección de dominios variables humanos, tanto livianos como pesados, que serán empleados para fabricar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocido. Entonces, la secuencia humana que más se acerca a la del roedor se acepta como el soporte humano para el anticuerpo humanizado (Sims y colaboradores (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia y colaboradores (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro método emplea un soporte particular derivado de la secuencia consensual de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadena liviana o de cadena pesada. Se puede emplear el mismo soporte para diferentes anticuerpos humanizados (Carter y colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:4285; Presta y colaboradores (1993) *J. Immunol.* 151:2623.

Adicionalmente es importante que los anticuerpos sean humanizados con la conservación de la alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar esta finalidad, de acuerdo con un método, se preparan unos anticuerpos humanizados por medio de un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y varios productos humanizados conceptuales empleando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles en forma común y aquellos con destreza en el arte están familiarizados con estos. Existen unos programas de computador que ilustran y representan unas estructuras tridimensionales probables de conformación de unas secuencias de inmunoglobulina de candidatos seleccionados. La inspección de estos muestrarios permite analizar el posible papel que juegan los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata. Es decir, analizar los residuos que influyen la habilidad de la inmunoglobulina candidata para fijar su antígeno. De esta forma, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar de las secuencias de receptor y de importación de manera que se obtiene la característica deseada del anticuerpo, como una mayor afinidad para el (los) antígeno(s) objetivo(s). En general, los residuos de la región hipervariable están directamente, y con seguridad sustancialmente, comprometidos en la influencia sobre la fijación del antígeno.

Variantes del anticuerpo

En un aspecto, la invención dispone un fragmento de anticuerpo que comprende modificaciones en la interface de los polipéptidos Fcs que comprende

la región Fc, donde las modificaciones facilitan y/o estimulan la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, donde la protuberancia se puede posicionar en la cavidad con el fin de estimular la combinación del primer y del segundo polipéptido Fcs. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones son conocidos en el arte, por ejemplo, como se describe en Patente de Estados Unidos No. 5,731,168.

En algunas incorporaciones, se contempla(n) modificación(es) de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo introduciendo unos cambios apropiados de nucleótido en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante la síntesis peptida. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones del aminoácido se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sujeto en el momento que se hace esa secuencia.

Un método útil para identificar ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son sitios preferidos para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido mediante alanina" como lo describen Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Aquí se identifica un residuo o un grupo de residuos objetivo (*por ejemplo*, residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o de carga negativa (más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Esas ubicaciones de aminoácido que muestran una sensibilidad funcional a la sustitución posteriormente se refinan al introducir otro y otros variantes en o para los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque se predetermina el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación *per se* no tiene que estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el desempeño de una mutación en un sitio dado, el barrido ala o la mutagénesis aleatoria se realiza en el codón o en la región objetivo y las inmunoglobulinas expresadas se criban para apreciar su actividad deseada.

Inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en el terminal amino- y/o carboxilo cuya longitud varía de un residuo a polipéptidas conteniendo

204

cien o más residuos, al igual que inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos sencillos o múltiples. Ejemplos de inserciones en el terminal incluyen un anticuerpo con un residuo N-terminal metionilo o el anticuerpo fusionado a una polipéptida citotóxica. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión al terminal N- o C- del anticuerpo a una enzima (*por ejemplo* para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media del suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula del anticuerpo que fue reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se pueden contemplar las alteraciones FR. En la Tabla 2 se muestran unas sustituciones conservadoras bajo el título de “sustituciones preferidas”. Si dichas sustituciones resultan en un cambio de la actividad biológica, entonces se pueden introducir unos cambios más sustancialmente, denominados “sustituciones ejemplares” en la Tabla 2, o como se describe adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se pueden cribar.

TABLA 2

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg

203
205

Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se logran unas modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo cuando se seleccionan unas sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la columna de la polipéptida en el área de la sustitución, por ejemplo, como una hoja o una conformación helical, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo o (c) el peso de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con similitudes de las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, in Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M) no polar
- (2) Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q) sin carga polar
- (3) Asp (D), Glu (E) ácido
- (4) Lys (K), Arg (R), His(H) básico

Alternativamente, los residuos naturales se pueden dividir en grupos con base en las propiedades de las cadenas laterales comunes:

- (1) hidrófoba: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílica neutral: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácida: Asp, Glu;
- (4) básica: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromática: Trp, Tyr, Phe.

Unas sustituciones no conservadoras implican intercambiar un miembro de una de esas clases por otra clase. Los citados residuos sustituidos también se

204
206

pueden introducir en los sitios de sustitución conservadores, o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

Un tipo de variante sustitucional comprende sustituir uno o varios residuos de región hipervariable de un anticuerpo progenitor (*por ejemplo* un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para un desarrollo posterior tendrá(n) unas características biológicas mejoradas con relación al anticuerpo progenitor a partir del cual se generaron. Una forma conveniente para generar los citados variantes sustitucionales comprende la maduración de afinidad empleando una presentación fago. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (*por ejemplo* 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Por lo tanto, los anticuerpos generados se muestran en unas partículas fagos filamentosas como fusiones del gen III como resultado del M 13 empacado en cada partícula. Las variantes fagos desplegadas se criban para conocer su actividad biológica (*por ejemplo* su afinidad de unión) como se divulga en la presente. Con el fin de identificar candidatos de sitios de región hipervariable para modificación, se puede efectuar una mutagénesis de barrido por alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura de cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y los residuos cercanos son candidatos para la sustitución, de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente. Una vez se generen las citadas variantes, el panel de variantes se somete a cribado, como se describe en la presente, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o varios análisis relevantes se pueden seleccionar para su desarrollo posterior.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada previamente o de una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o varias modificaciones del aminoácido en una región Fc de las polipéptidas de la inmunoglobulina de la invención, generando en esta forma la variante de región Fc. La variante de región Fc puede

201
207

comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, un IgG1, IgG2, IgG3 humano o una región IgG4 Fc) que comprende una modificación del aminoácido (por ejemplo una sustitución) en una o varias posiciones del aminoácido incluyendo la de una cisteína bisagra.

De conformidad con esta descripción y las enseñanzas del arte, se contempla que en algunas incorporaciones, un anticuerpo empleado en los métodos de la invención puede comprender una o varias alteraciones cuando se compara con la contraparte del anticuerpo natural, por ejemplo en la región Fc. Sin embargo, estos anticuerpos sustancialmente conservarían las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica cuando se comparan con su contraparte natural. Por ejemplo, se cree que se pueden efectuar determinadas alteraciones en la región Fc que resultarían en una unión C1q alterada (*es decir*, bien sea mejorada o disminuida) y/o una Citotoxicidad Dependiente Complementaria (CDC), por ejemplo, como se describe en WO99/51642. Consultar también Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); Patente de Estados Unidos No. 5,648,260; Patente de Estados Unidos No. 5,624,821; y WO94/29351 con relación a otros ejemplos de las variantes de la región Fc.

Inmunos conjugados

La invención igualmente se relaciona con inmunos conjugados, o conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor de crecimiento, una toxina (*por ejemplo*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fungal, de planta o animal, fragmentos de los mismos) o un isótopo radioactivo (*es decir*, un radioconjugado).

El uso de conjugados anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos para matar o inhibir las células del tumor en el tratamiento del cáncer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151- 172; Patente de Estados Unidos 4,975,278) teóricamente permite la administración dirigida de una fracción del fármaco a los tumores y la acumulación intracelular en la misma, cuando la administración sistémica de estos agentes de fármaco sin conjugar pueden resultar en unos niveles de toxicidad inaceptables para las células normales, al igual que las células del tumor que se buscan eliminar (Baldwin y colaboradores, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A.

206
208

Pinchera y colaboradores (ed.s), pp. 475-506). Por este medio se busca la eficacia máxima con la toxicidad mínima. Se ha reportado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland y colaboradores, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183- 87). Los fármacos empleados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland y colaboradores, (1986) *supra*). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas como la toxina de difteria, las toxinas de plantas como la ricina, las toxinas de molécula pequeña como geldanamicina (Mandler y colaboradores, (2000) *Tour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler y colaboradores, (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler y colaboradores, (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786- 791), maitansinoides (EP 1391213; Liu y colaboradores, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y calicheamicina (Lode y colaboradores, (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman y colaboradores, (1993) *Cancer Res.* 53:3336- 3342). Las toxinas pueden desencadenar su efecto citotóxico y citostático mediante mecanismos que incluyen la unión por tubulina, la unión de ADN o la inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o con ligandos de proteína aceptor.

ZEVALES® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal murino IgG1 kappa dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos normales y malignos B y en el radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y fijado por un quelante de unión de tiourea (Wiseman y colaboradores, (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman y colaboradores, (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig y colaboradores, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig y colaboradores, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma de célula B no-Hodgkin's (NHL), la administración resulta en una citopenia severa y prolongada en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo fármaco compuesto por un anticuerpo hu CD33 enlazado a la calicheamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; Patentes de Estados Unidos Nos. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado anticuerpo fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado mediante el

enlazante disulfido SPP a la fracción de fármaco maitansinoide, DMI, está progresando hacia pruebas de la Fase III para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, como de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), un conjugado anticuerpo fármaco compuesto por el antígeno prostático específico de membrana (PSMA), el anticuerpo monoclonal enlazado a la fracción de fármaco maitansinoide, DM1, se está desarrollando para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Las peptidas auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico de Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico a CD30 en malignidades hemáticas) (Doronina y colaboradores, (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) y están bajo desarrollo terapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito arriba. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden emplear incluyen difteria de cadena A, fragmentos activos no enlazantes de la toxina difteria, la exotoxina de cadena A (de *Pseudomonas aeruginosa*), ricina de cadena A, abrina de cadena A, modeccina de cadena A, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionúclidos se encuentran disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican empleando una variedad de proteínas-agentes de acoplamiento bifuncionales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como disuccinimidil suberato), aldehidos (como glutaraldehido), compuestos bis-azido (como (p-azidobenzoilo) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoilo)- etilenediamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos bis-activos de flúor (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina ricina como se describe en Vitetta y colaboradores, Science, 238: 1098 (1987). Carbono-14-marcado 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen ácido triaminapentaacético (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Consultar WO94/11026.

En la presente también se contemplan los conjugados de un anticuerpo y una o varias toxinas de molécula pequeña, como calicheamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC 1065 y los derivados de estas toxinas que tienen una actividad de toxina.

Maitansina y maitansinoides

En una incorporación, un anticuerpo (de longitud total o fragmentos) de la invención se conjuga con una o varias moléculas maitansinoides.

Las maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan mediante la inhibición de la polimerización tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de este de África *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos No. 3,896,111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, como maitansinol y C-3 maitansinol ésteres (Patente de Estados Unidos No. 4,151,042). Se divulgan maitansinol sintético y derivados y análogos de los mismos por ejemplo en Patentes de Estados Unidos Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente a la presente por referencia.

Conjugados maitansinoide-anticuerpo

En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado a anticuerpos fijándose específicamente a los antígenos de las células de tumor. Los inmunoconjugados conteniendo maitansinoides y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,020, 5,416,064 y en Patente Europea EP 0 425 235 B 1, cuya divulgación se incorpora expresamente a la presente por referencia. Liu y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describió unos inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DMI fijado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico frente a las células cultivadas del cáncer de colon y mostraba una actividad antitumoral en un análisis de crecimiento de tumor *in vivo*. Chari y colaboradores, Cancer Research 52:127-131 (1992) describe los inmunoconjugados en los cuales un maitansinoide se conjuga mediante un enlazante disulfido al anticuerpo murino A7 fijándose a un antígeno en unas estirpes celulares de cáncer de colon humano o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que fija el oncógeno HER-2/*neu*. La citotoxicidad de un conjugado maitansinoide TA.1 se ensayó *in vitro* en la estirpe celular del cáncer

de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 HER-2 antígenos de superficie por célula. El conjugado del fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría ser incrementado al aumentar el número de moléculas maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Conjugados anticuerpo-maitansinoide (inmunconjugados)

Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica ni de la molécula del anticuerpo ni de la molécula del maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado ser eficiente en aumentar la citotoxicidad para las células objetivo sin afectar de forma negativa la función o la solubilidad del anticuerpo, incluso si se llegara a esperar que una molécula de toxina/anticuerpo aumente la citotoxicidad sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en el arte y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o se pueden aislar a partir de fuentes naturales. Unos maitansinoides apropiados se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 y en las otras patentes y publicaciones no relacionadas con patentes citadas en la presente arriba. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, como varios ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de unión conocidos en el arte para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, aquellos divulgados en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 o en Patente EP 0 425 235 B1 y Chari y colaboradores, Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de unión incluyen grupos disulfido, grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa, o grupos lábiles ésterasa, como se divulga en las patentes identificadas arriba, y los grupos disulfido y tioéter siendo los preferidos.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar empleando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-l-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como disuccinimidil suberato), aldehidos (como glutaraldehido), compuestos bis-

azido (como bis (p-azidobenzoilo) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoilo)-etilenediamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos bis-activos de flúor (como 1,5- difluoro-2,4-dinitrobenceno). Particularmente los agentes de acoplamiento preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2- piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson y colaboradores, Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N- succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para disponer una unión disulfida.

El enlazante se puede adherir a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, una unión éster se puede formar mediante la reacción con un grupo hidroxilo empleando unas técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 con un grupo hidroxilo, modificar la posición C-14 con hidroximetilo, modificar la posición C-15 con un grupo hidroxilo y la posición C-20 teniendo un grupo hidroxilo. En una incorporación preferida, la unión se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Calicheamicina

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o varias moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos calicheamicina es capaz de producir rupturas de ADN de doble hebra a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de los conjugados de la familia de calicheamicinas, consultar las Patentes de Estados Unidos 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (Todas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la calicheamicina que se pueden emplear, incluyen, pero no se limitan a, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ^I (Hinman y colaboradores, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode y colaboradores, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las Patentes de Estados Unidos a American Cyanamid citadas arriba). Otro fármaco antitumoral con el cual se puede conjugar el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la calicheamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana del plasma. Por lo tanto, la absorción celular de estos agentes mediante la internalización mediada por el anticuerpo aumenta significativamente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracil, la familia de agentes conocidos conjuntamente como el complejo LL- E33288 descrito en las

Patentes de Estados Unidos 5,053,394, 5,770,710, al igual que las esperamicinas (Patente de Estados Unidos 5,877,296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de los mismos que se utilizan incluyen difteria de cadena A, fragmentos activos que no se fijan de la toxina difteria, exotoxina de cadena A (de *Pseudomonas aeruginosa*), ricina de cadena A, abrina de cadena A, modeccina de cadena A, alfa-sarcina, Aleuritos fordii proteínas, proteínas diantina, proteínas *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Consultar por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre, 1993.

La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o un ADN endonucleasa como una deoxiribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Una variedad de isótopos radioactivos está disponible para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o un marcador giratorio para imágenes de resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocido como imágenes de resonancia magnética, mri), como iodina-123 de nuevo, iodina-131, indium-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores o los otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado mediante formas conocidas. Por ejemplo, la peptida se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando unos precursores de aminoácidos apropiados comprendiendo, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores como tc^{m} o I^{123} , Re^{18} , Re^{88} e In^{111} se pueden adherir mediante un residuo de cisteína en la peptida. Se puede adherir Yttrium-90 mediante un residuo de lisina. Se puede utilizar el método IODOGEN (Fraker y colaboradores, (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 para incorporar iodina-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal.CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Los conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico se pueden preparar empleando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales

como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil- 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como disuccinimidil suberato), aldehidos (como glutaraldehido), compuestos de bis-azido (como bis (p-azidobenzoilo) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoilo)-etilenediamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos bis-activos de flúor (como 1,5- difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta y colaboradores, Science 238:1098 (1987). Carbono-14-marcado l-isotiocianatobencil-3- metildietilen ácido triaminapentaacético (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Consultar WO94/11026. El enlazante puede ser un "enlazante de segmentación" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazante ácido lábil, un enlazante sensible a la peptidasa, un enlazante fotolábil, un enlazante dimetilo o un enlazante conteniendo disulfido (Chari y colaboradores, Cancer Research 52:127-131 (1992); Patente de Estados Unidos No. 5,208,020) .

Los compuestos de la invención expresamente contemplan, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos de enlace cruzado: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el comercio (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Consultar páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados anticuerpo fármaco

En los conjugados anticuerpo fármaco (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga con una o varias fracciones del fármaco (D), por ejemplo alrededor de 1 hasta alrededor de 20 fracciones de fármaco por anticuerpo, a través de un enlazante (L). El ADC de Fórmula I se puede preparar a través de diferentes formas, empleando reacciones químicas orgánicas, bajo condiciones y con reactivos conocidos por aquellos con destreza en el arte: (1) la reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazante bivalente para formar Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido por la reacción con una fracción del fármaco D; y (2) la reacción de un grupo nucleofílico de una fracción de fármaco con un reactivo enlazante bivalente, para formar D-L, a través de un

enlace covalente, seguido por una reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo.

Ab-(L-D)p

I

Los grupos nucleofílicos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina N-terminal, (ii) grupos amina cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol cadena lateral, por ejemplo cisteína y (iv) grupo hidróxilo del azúcar y grupos amino donde el anticuerpo se glicosila. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y tienen la capacidad de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en fracciones enlazantes y reactivos enlazantes incluyendo: (i) ésteres activos como NHS ésteres, HOBt ésteres, haloformatos y ácidos hálidos; (ii) hálidos alquilo y bencilo como haloacetamidas; (iii) aldehidos, cetonas, carboxilos y grupos maleimida. Ciertos anticuerpos tienen unos disulfidos reducibles entre cadenas, es decir unos puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer reactivos para la conjugación con reactivos enlazantes mediante el tratamiento con un agente reductor como DTT (ditiotreitolo). Por lo tanto, cada puente de cisteína forma, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Se pueden introducir unos grupos nucleofílicos adicionales en los anticuerpos mediante la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) resultando en la conversión de una amina a un tiol.

Los conjugados anticuerpo fármaco de la invención también se pueden producir mediante la modificación del anticuerpo para introducir unas fracciones electrofílicas, que pueden reaccionar con radicales nucleofílicos en el reactivo o fármaco enlazante. Los azúcares de los anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo con reactivos periodatos oxidantes para formar grupos aldehidos o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de las fracciones de los reactivos o fármacos del enlazante. Los grupos resultantes imina base Schiff pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo por reactivos borohidruro para formar unas uniones amina estables. En una incorporación, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado bien sea con glactosa oxidasa o con sodio meta-periodato puede producir carbonilo (grupos aldehído y cetona) en la proteína que puede reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra incorporación, las proteínas conteniendo residuos serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con sodio meta-periodato, resultando en la producción

de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Dicho aldehído se puede hacer reaccionar con una fracción de fármaco o con el nucleófilo enlazante.

De igual manera, los grupos nucleofílicos en una fracción de fármaco incluyen, pero no se limitan a: amina, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato y grupos arilhidracida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en fracciones de enlace y reactivos de enlace incluyendo: (i) ésteres activos como NHS ésteres, HOBt ésteres, haloformatos y ácido hálidos; (ii) alquilo y bencilo hálidos como haloacetamidas; (iii) grupos aldehidos, cetonas, carboxilos y maleimida.

Alternativamente, se puede hacer una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o la síntesis de peptidas. La longitud del ADN puede comprender las regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, bien sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifican una peptida enlazante que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En aún otra incorporación, el anticuerpo se puede conjugar con un "aceptor" (como estreptavidina) para la utilización en el pre-direccionamiento del tumor donde el conjugado anticuerpo-aceptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin fijar de la circulación utilizando un agente de depuración y luego se administra un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar aún más para contener unas fracciones no proteináceas adicionales conocidas en el arte y fácilmente disponibles. Preferiblemente, las fracciones apropiadas para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero anhídrido etilen/maleico, poliaminoácidos (bien sea homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros propilenglicol, co-polímeros prolipropilen óxido/etil óxido, polioles polioxietilados (por ejemplo, Glicerol), polivinil alcohol y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la manufactura debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede

24
2/7

tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar y si tiene más de un polímero adherido, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o el tipo de polímeros empleado para la derivatización se puede determinar con base en unas consideraciones incluyendo, pero no limitado a, las propiedades particulares o las funciones del anticuerpo que se busca mejorar, así el anticuerpo derivado se vaya a emplear en una terapia bajo unas condiciones definidas, etc.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención están preparadas para ser almacenadas, mezclando el anticuerpo con el grado de pureza deseado con unos excipientes opcionales fisiológicamente aceptables, excipientes o estabilizantes (Pharmaceutical Sciences de Remington Edición 16, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Unos excipientes aceptables, unos excipientes o estabilizantes no son tóxicos para los receptores en las dosis y a las concentraciones empleadas, e incluyen soluciones amortiguadoras como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina, conservantes (como cloruro de amonio octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o bencil alcohol; alquilo parabenos como metil o propil parabeno; catechol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidas de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas como albúmina en suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, mannososa, o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, mannitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales como sodio, complejos metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación en la presente también puede contener más de un compuesto activo, según sea necesario, para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no tienen un efecto adverso entre sí. Las citadas moléculas están convenientemente presentes en cantidades efectivas para el fin que se busca.

Los ingredientes activos también se pueden guardar en una microcápsula, preparada por ejemplo, por medio de unas técnicas de coacervación o mediante

una polimerización interfacial, por ejemplo, un microcápsula de hidroximetilcelulosa o de gelatina y una microcápsula de poli-(metilmetacilato) respectivamente en sistemas de administración coloidales para fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Pharmaceutical Sciences de Remington Edición 16, Osol, A. Ed. (1980).

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

Se pueden preparar unas preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrofóbicos conteniendo la inmunoglobulina de la invención, matrices estas que tienen la forma de unos artículos formados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y yetil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables ácido láctico ácido glicólico como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero ácido láctico ácido glicólico y acetato leuprolida) y poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico. Aunque los polímeros como etilen-vinil acetato y copolímero ácido láctico ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante un periodo de tiempo más corto. Cuando se encapsulan, las inmunoglobulinas permanecen en el cuerpo durante un largo periodo de tiempo, se pueden desnaturalizar o unir como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en la pérdida de la actividad biológica y en posibles cambios de inmunogenicidad. Se pueden contemplar unas estrategias racionales para la estabilización, dependiendo del mecanismo comprometido. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de unión es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante un intercambio tio-disulfido, se puede alcanzar la estabilidad modificando los residuos sulfhidrilos, mediante liofilización de soluciones acídicas, controlando el contenido de humedad, empleando unos aditivos apropiados y desarrollando unas composiciones específicas de matrices de polímero.

Usos

Un anticuerpo de la presente invención se puede emplear, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Los anticuerpos de la invención se pueden emplear como un antagonista para bloquear parcial o totalmente la actividad del antígeno específico *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*. Adicionalmente, por lo menos algunos de los anticuerpos de la invención pueden neutralizar la actividad del antígeno de otras especies. Por lo tanto, se pueden utilizar los anticuerpos de la invención para inhibir una actividad de un antígeno específico, por ejemplo, en un cultivo de células conteniendo el antígeno, en individuos humanos o en otros individuos mamíferos teniendo el antígeno con el cual un anticuerpo de la invención reacciona en forma cruzada (por ejemplo chimpancé, mandril, tití, mono de Java y rhesus, cerdo o ratón). En una incorporación, se puede emplear el anticuerpo de la invención para inhibir las actividades del antígeno al poner en contacto el anticuerpo con el antígeno de manera que la actividad del antígeno queda inhibida. Preferiblemente, el antígeno es una molécula de proteína humana.

En una incorporación, se puede utilizar un anticuerpo de la invención en un método para inhibir un antígeno en un individuo que padece un desorden en el cual la actividad del antígeno es perjudicial, que comprende administrar al individuo un anticuerpo de la invención de manera que la actividad del antígeno en el individuo queda inhibida. Preferiblemente, el antígeno es una molécula de proteína humana y el individuo es un humano. Alternativamente, los individuos pueden ser mamíferos que expresan el antígeno con el cual se une el anticuerpo de la invención. Para ir más allá, el individuo puede ser un mamífero en el cual se introdujo el antígeno o mediante la expresión de un transgén del antígeno). Se puede administrar un anticuerpo de la invención a un individuo humano con fines terapéuticos. Adicionalmente se puede administrar un anticuerpo de la invención a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el cual la inmunoglobulina tiene una reacción cruzada (por ejemplo, un primate, un cerdo o un ratón) con fines veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Con respecto a esta última, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, pruebas de dosis y periodos de tiempo para administración). Los anticuerpos de bloqueo de la invención que son terapéuticamente útiles incluyen, por ejemplo pero no se limitan a, factores de anticuerpos anti-HER2, anti-VEGF, anti-IgE, anti-CDI I, anti-interferón y anti-tejidos. Los anticuerpos de la invención se pueden emplear para tratar, inhibir, retrasar la progresión de, prevenir/retrasar la recurrencia de, mejorar o prevenir enfermedades, desórdenes o condiciones asociadas con la expresión

y/o actividad anormal de una o varias moléculas del antígeno, incluyendo pero no limitado a tumores malignos y benignos; neoplasias no relacionadas con leucemia y linfoides; desórdenes neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicas y otros desórdenes glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales y blastocoélicos; y desórdenes inflamatorios, inmunológicos y otros desórdenes relacionados con la angiogénesis y desórdenes inmunológicos.

En un aspecto, un anticuerpo de bloqueo de la invención es específico para un ligando de un antígeno e inhibe la actividad del antígeno al bloquear o interferir en la interacción ligando-aceptor comprometiendo el ligando del antígeno, y en esta forma inhibiendo la respectiva vía de señal y otros eventos moleculares o celulares. La invención también caracteriza los anticuerpos -aceptor específicos que no necesariamente evitan que el ligando se una pero interfieren con la activación del receptor, y en esta forma inhiben cualquier respuesta que normalmente sería iniciada por la unión del ligando. La invención también abarca los anticuerpos que preferiblemente o exclusivamente se unen a complejos ligando-aceptor. Un anticuerpo de la invención también puede actuar como un agonista de un antígeno aceptor particular, en esta forma potenciando, aumentando o activando todas las actividades o parte de las actividades de la activación ligando-mediado por aceptor.

En ciertas incorporaciones, se administra un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico al paciente. En algunas incorporaciones, el inmunoconjugado y/o el antígeno al cual está unido se internaliza(n) por la célula, resultando en una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado al matar la célula objetivo a la cual se une. En una incorporación, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con el ácido nucleico en la célula objetivo. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los quimioagentes terapéuticos notados en la presente (como un maitansinoide o una calicheamicina), un isótopo radioactivo o una ribonucleasa o un ADN endonucleasa.

Los anticuerpos de la invención se pueden emplear bien sea solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, se puede co-administrar un anticuerpo de la invención con otro anticuerpo, agente(s) quimioterapéutico(s) (incluyendo cócteles de quimioagentes terapéuticos), otro(s) agente(s) citotóxico(s), agente(s) anti-angiogénico(s), citosina(s) y/o agente(s) inhibidor(es) de crecimiento. Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento de un tumor, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno

219
221

o varios agente(s) terapéutico(s) que también inhibe(n) el crecimiento del tumor. Por ejemplo, se puede combinar un anticuerpo de la invención con un anticuerpo anti-VEGF (*por ejemplo*, AVASTIN) y/o anticuerpos anti-ErbB (*por ejemplo* HERCEPTIN® anticuerpo anti-HER2) es un esquema de tratamiento, por ejemplo al tratar cualquiera de las enfermedades descritas en la presente, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer metastático de mama y cáncer de riñón. Alternativamente, o adicionalmente, el paciente puede recibir una terapia de radiación combinada (por ejemplo irradiación de haz externo o terapia con un agente con marcación radioactiva, como un anticuerpo). Dichas terapias combinadas notadas arriba incluyen la administración combinada (cuando se incluyen dos o más agentes en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede hacerse antes y/o después de la administración de la terapia o terapias complementarias.

El anticuerpo de la invención (y el agente terapéutico complementario) se administran a través de cualquier medio apropiado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y si se desea para el tratamiento local, mediante administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Adicionalmente, el anticuerpo se administra apropiadamente mediante infusión por pulsos, particularmente con un declive de dosis del anticuerpo. Las dosis pueden ser por cualquier vía apropiada, por ejemplo por inyecciones como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La composición del anticuerpo de la invención será formulada, dosificada y administrada en una forma consistente con una buena práctica médica. Los factores que se deben considerar en este contexto incluyen el desorden particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa del desorden, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los practicantes de la medicina. El anticuerpo no tiene que formularse, pero opcionalmente se formula con uno o varios agentes empleados en la actualidad para prevenir o tratar el desorden en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, del tipo de desorden o del tratamiento y de otros factores discutidos arriba. Estos generalmente se utilizan con las mismas

dosis y con las vías de administración empleadas anteriormente o en alrededor de 1 a 99% de las dosis empleadas en el pasado.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se emplea solo o combinado con otros agentes como quimioagentes terapéuticos) va a depender del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y del progreso de la enfermedad, sin perjuicio de que el anticuerpo se administre con fines preventivos o terapéuticos, de terapias anteriores, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo y de la discreción del facultativo atendiendo el caso. El anticuerpo se administra apropiadamente al paciente mediante un tratamiento de una sola dosis o a través de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, alrededor de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0.1mg/kg-10mg/kg) de anticuerpo es un candidato de dosis inicial para la administración al paciente, así, por ejemplo, mediante una o varias administraciones separadas o a través de una infusión continua. Una dosis diaria típica puede variar desde alrededor de 1 µg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores citados arriba. Para una administración repetida sobre un periodo de varios días o un periodo más largo, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostiene hasta alcanzar una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo estaría en el rango desde alrededor de 0.05 mg/kg hasta alrededor de 10mg/kg. Por lo tanto, una o varias dosis de alrededor de 0.5mg/kg, 2.0mg/kg, 4.0mg/kg o 10mg/kg (o cualquier combinación de estas) se puede administrar al paciente. Dichas dosis se pueden administrar en forma intermitente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de manera que el paciente reciba desde alrededor de dos hasta alrededor de veinte, por ejemplo alrededor de seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una carga de dosis inicial más alta, seguida por una o varias dosis menores. Un ejemplo de un régimen de dosis comprende administrar una carga de dosis inicial de alrededor de 4 mg/kg, seguida por una dosis semanal de mantenimiento de alrededor de 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. Es fácil monitorear el progreso de esta terapia mediante unas técnicas convencionales y unos análisis.

Artículos de manufactura

En otro aspecto de la invención, se dispone un artículo de manufactura conteniendo materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los desórdenes descritos arriba. El artículo de manufactura comprende un

envase y una etiqueta o un inserto en el paquete en o asociado con el envase. Unos envases apropiados incluyen, por ejemplo, botellas, ampollas, jeringas, etc. Los envases se pueden formar a partir de una variedad de materiales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición, que es por sí misma o cuando se combina con otra composición, efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser una bolsa con una solución intravenosa o una ampolla con un tapón que se puede perforar con una aguja de una jeringa hipodérmica). Por lo menos un agente activo en una composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el inserto en el paquete indican que una composición se utiliza para tratar la condición escogida, como el cáncer. Además, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo, donde una composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, donde una composición comprende otro agente citotóxico. El artículo de manufactura en esta incorporación de la invención puede comprender además un inserto en el paquete que indica las composiciones del primer y del segundo anticuerpo, que se pueden emplear para tratar una condición particular, por ejemplo cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de manufactura puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende una solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable, como agua bacterioestática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Los siguientes son ejemplos de los métodos y las composiciones de la invención. Se entiende que se pueden realizar otras varias incorporaciones dada la descripción general presentada arriba.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Los números de residuo son de acuerdo con Kabat (Kabat y colaboradores, *Sequences of proteins of immunological interest*, Edición 5, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se emplean abreviaturas de una sola letra para los aminoácidos. Las degeneraciones del ADN se representan

mediante el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = P/J/G, S = G/C, W = P/J/T y = C/T).

La región hipervariable directa se transplanta en el soporte consensual humano aceptor – El fago empleado para este trabajo es un vector de muestrario monovalente Fab-g3 (pV0350-2B) que tiene 2 soportes de lectura abiertos bajo el control del promotor phoA, esencialmente como se describe en Lee y colaboradores, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5): 1073-93. El primer soporte de lectura abierto consiste en la secuencia de señal stII fusionada a los dominios VL y CH1 de cadena liviana del aceptor y el segundo consiste en la secuencia de señal stII fusionada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada del aceptor seguido por una proteína de cubierta fago menor truncada P3. Consultar Lee y colaboradores, *supra*.

Los dominios VL y VH de murino 5D5 (consultar hibridoma 5D5.11.6, ATCC Depósito No. HB-11895, fecha de depósito mayo 23, 1995) se alinearon con el consenso humano kappa I (huII) y los dominios VH del consenso de subgrupo humano III (huIH). Para efectuar el trasplante HVR, se utilizó el soporte VH del aceptor, que difiere del consenso del dominio VH del subgrupo humano en 3 posiciones: R71A, N73T y L78A (Carter y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:4285 (1992)). Las regiones hipervariables del anticuerpo murino 5D5 (mu5D5) se concibieron en el soporte consensual humano aceptor para generar un trasplante HVR- directo de 5D5 (trasplante 5D5). En el dominio VL, las siguientes regiones se transplantaron en el consenso humano aceptor: posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3). En el dominio VH, se transplantaron las posiciones 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 95-102 (H3) (Figura 1).

Las variantes de trasplante directo se generaron por la mutagénesis Kunkel empleando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Los clones correctos se evaluaron mediante un secuenciado de ADN.

Aleatorización restringida de las regiones hipervariables - Se introdujo una diversidad de secuencia en cada región hipervariable empleando una estrategia de aleatorización restringida que mantiene una inclinación hacia la región hipervariable de la secuencia murina. Esto se logró utilizando una estrategia de síntesis de oligonucleótido envenenado como lo describe Gallop y colaboradores, *J. Med. Chem.* 37: 1233-1251 (1994). Para que una posición dada en una región hipervariable sea mutada, el codón que codifica el aminoácido natural se envenena con una mezcla 70-10-10-10 de nucleótidos resultando en una tasa promedio de mutación del 50 por ciento en cada posición.

223
225

Los oligonucleótidos de aleatorización restringida siguieron el patrón de la región hipervariable de las secuencias murina y abarcaron las mismas regiones definidas por los trasplantes directos de región hipervariable. La posición del aminoácido al comienzo de H2 (posición 49) en el dominio VH, estaba limitada, en cuanto a diversidad de secuencia a A, G, S o T por emplear el codón RGC.

Generación de bibliotecas fago – Combinaciones de oligonucleótidos seleccionados aleatoriamente para cada región hipervariable se fosforilaron por separado en seis reacciones de 20 μ l conteniendo 660 ng de oligonucleótido, 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 20 mM DTT y 5 U polinucleótido cinasa durante 1 h a 37°C. Luego los seis conjuntos de oligonucleótidos fosforilados se combinaron con 20 μ g de molécula patrón Kunkel en 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$ en un volumen final de 500 μ l resultando en un oligonucleótido con una proporción de molécula patrón de 3. La mezcla se hibridó a 90°C durante 4 min, 50°C durante 5 min y luego se enfrió sobre hielo. El oligonucleótido sin hibridar sobrante se extrajo con un estuche de purificación QIAQUICK PCR (Qiagen estuche 28106) empleando un protocolo modificado para evitar una excesiva desnaturalización del ADN hibridado. A los 500 μ l de la mezcla hibridada se agregaron 150 μ l de PB y la mezcla se dividió en dos columnas de sílice. Después de lavar cada columna con 750 μ l de PE y de una agitación adicional para secar las columnas, cada columna se levigó con 110 μ l de 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8. Luego la molécula patrón hibridada y limpia (220 μ l) se completó al agregar 1 μ l 100mM ATP, 10 μ l 25mM dNTPs (25mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 15 μ l 100mM DTT, 25 μ l 10X TM solución amortiguadora (0.5 M Tris pH 7.5, 0.1 M $MgCl_2$), 2400 U T4 ligasa y 30 U T7 polimerasa durante 3 h a temperatura ambiente.

El producto completado se analizó en Tris-Acetato-EDTA/geles de agarosa (Sidhu y colaboradores, *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000)). Normalmente había tres bandas visibles: la banda inferior es un producto completado y ligado correctamente, la banda del centro es un producto completado pero no ligado y la banda superior es un producto de filamento desplazado. La banda superior se produce por una actividad lateral intrínseca de polimerasa T7 y es difícil de evitar (Lechner y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 258:11174-11184 (1983)); sin embargo, esta banda se transforma 30 veces menos eficientemente que la banda inferior y normalmente aporta muy poco a la biblioteca. La banda del centro se debe a la ausencia de un fosfato 5' para la

reacción final de ligado; esta banda se transforma eficientemente y básicamente produce la secuencia de tipo natural.

Luego el producto completado se limpió y se sometió a electroporado en células SS320 y se propagó en presencia de fago cooperador M13/KO7 como lo describen Sidhu y colaboradores, *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000). Los tamaños de la biblioteca variaron de $1 - 2 \times 10^9$ clones independientes. Los clones aleatorios de las bibliotecas iniciales se secuenciaron para evaluar la calidad de la biblioteca.

Selección fago - El aceptor humano FCH se generó y se utilizó como una fusión Fc (HGFR- Fc) (Mark y colaboradores, *J. Biol. Chem.* (1992), 267:26166-26171). Se aplicó una capa de HGFR-Fc a unas placas de microtítulo de MaxiSorp (Nunc) a 5 µg/ml en PBS. Para la primera ronda de selección, se emplearon 8 pozos objetivo; se empleó un solo pozo objetivo para las siguientes rondas de selección. Los pozos se bloquearon durante 1 h utilizando Casein Blocker (Pierce). Los fagos se recolectaron del supernadante del cultivo y se suspendieron en PBS conteniendo 1 % BSA y 0.05 % TWEEN 20 (PBSBT). Después de la unión en los pozos durante 2 h, los fagos no unidos se extrajeron mediante extenso lavado con PBS conteniendo 0.05 % TWEEN 20 (PBST). Los fagos unidos se levigaron mediante la incubación de los pozos con 50 mM HCl, 0.5 M KCl durante 30 min. Los fagos se amplificaron empleando células Top10 y fago cooperador M13/KO7 y se cultivaron durante la noche a 37°C en 2YT, 50 µg/ml carbanecilina. Los títulos de los fagos levigados de un pozo objetivo recubierto se compararon con los títulos de un pozo no-objetivo recubierto para evaluar el enriquecimiento.

Para la maduración de afinidad, las bibliotecas fago se clasificaron mediante una solución de método de clasificación. Se biotiniló HFGR-Fc al mezclar 500 µl de 3.6 mg/ml HGFR-Fc en PBS y 10 µl de 1 M fosfato de potasio, pH 8 con 20 µl 4 mM Sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce). El HGFR-Fc biotinilado (b-HGFR- Fc) se purificó utilizando una columna NAP5 (Amersham Biosciences) en PBS. Los pozos de microtítulos se recubrieron con 10 µg/ml neutravidina en PBS durante la noche a 4°C y luego se bloquearon durante 1 h empleando Casein Blocker (Pierce). En la primera ronda de paneo, se mezcló 200 µl fago suspendido en PBS conteniendo 0.05% Tween 20 (PBST) y 1 % BSA con 10 nM b-HGFR-Fc durante 1 hr. Los fagos unidos al b-HGFR-Fc se capturaron en unos pozos recubiertos con neutravidina durante 10 min y los fagos no unidos se retiraron mediante lavado con PBST. Los fagos se levigaron empleando 20 mM

HCl, 500 mM KCl durante 45 m, se neutralizaron y se propagaron en celdas azules XLI (Stratagene) en presencia de KO7 fago cooperador (New England Biolabs). Las rondas posteriores de clasificación se realizaron en forma similar con las siguientes excepciones: en la ronda 2 la concentración final de b-HGFR-Fc fue de 5.6 nM, en la ronda 3, la concentración final de b-HGFR-Fc fue 0.1 nM, en la ronda 4, la concentración final de b-HGFR-Fc fue 0.5 nM y se añadió 780 nM HGFR-Fc sin biotinilar a la mezcla durante 1 h antes de la captura en neutravidina.

Fago ELISA – Placas de microtítulos MaxiSorp se recubrieron con HGFR-Fc humano a 5 µg/ml en PBS durante la noche y luego se bloquearon con Casein Blocker. Los fagos de los supernadantes del cultivo se incubaron con HGFR-Fc diluido en serie en PBST conteniendo 1 % BSA en una placa de microtítulos para un cultivo de tejido durante 1 h. Después de esto, 80 µl de la mezcla se transfirieron a las placas objetivo recubiertas durante 15 min para capturar los fagos no unidos. La placa se lavó con PBST y se añadió conjugado HRP anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech) (1:5000 en PBST conteniendo 1 % BSA) durante 40 min. La placa se lavó con PBST y se desarrolló agregando sustrato de tetrametilbencidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La absorbencia a 405 nm se graficó como una función de la concentración objetivo en la solución para determinar un IC₅₀. Esto se utilizó como un estimado de afinidad para el clon Fab representado en la superficie del fago.

Producción Fab y determinación de la afinidad— Para expresar la proteína Fab para las mediciones de afinidad, se introdujo un codón de parada entre la cadena pesada y g3 en el vector de muestrario del fago. Los clones se transformaron en células E. coli 34B8 y se cultivaron en un medio AP5 a 30° C (Presta y colaboradores Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). Las células se recolectaron mediante centrifugación, se suspendieron en 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8 y se abrieron empleando un microfluidizador. Se purificó el Fab mediante una cromatografía de afinidad a la Proteína G.

Las determinaciones de afinidad se efectuaron mediante la resonancia por plasmón de superficie empleando un BIAcore™- 2000. Se inmovilizó el HGFR-Fc (-1000 unidades de respuesta (RU)) en una fracción CM5 y se inyectaron diferentes concentraciones de Fab (4 a 500 nM) en PBST. Después de cada inyección la fracción se regeneró empleando 100 mM HCl. La respuesta de unión se corrigió al restar la RU de una celda de flujo en blanco. Se utilizó un modelo Langmuir 1 : 1 para el ajuste simultáneo de I_{on} y k_{off} para el análisis cinético.

Análisis de electro- quimioluminiscencia para OA5D5 bloqueo de FCH / unión cMet

Se biotiniló la proteína cMet-Ig purificada producida por Genentech (South San Francisco, CA) mediante la incubación con NHS-X-Biotina de un excedente molar multiplicado por 20 en 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5 utilizando biotina-X-NHS (Research Organics, Cleveland, OH). Se marcó FCH humano purificado de 2 cadenas producido en Genentech con BV-TAG (cat # 110034) a través de química NHS-éster de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioVeris International, Gaithersburg, MD). Se incubó cMet-Ig-biotina (500 ng/mL), HGF-marcador rutenio (250 ng/mL) y titulaciones de anticuerpo OA5D5 variando de 3333-0.21 nM de anticuerpo en un volumen de 100 µl de diluyentes de análisis: PBS + 0.5% BSA / 0.5% Tween 20 / 0.033% Proclina (Supelco Inc. Bellefonte PA). Las mezclas se incubaron en unas placas en polipropileno selladas, de fondo redondo de 96 pozos (Corning) entre 2-4 horas a temperatura ambiente con agitación. Se añadieron glóbulos magnéticos de estreptavidina (Dynabeads, BioVeris). Después de una incubación final de 45 min con agitación vigorosa, las placas se leyeron empleando un instrumento BioVeris M-Series (BioVeris International, Gaithersburg, MD).

KIRA (FCH -dependiente -Met Fosforilación)

Células A549 (ATCC, Manassas, VA) se guardaron en un medio de crecimiento (F12/DMEM de Ham 50:50 [Gibco, Grand Island, NY] conteniendo 10% suero fetal bovino (FBS, Sigma, St. Louis, MO). Para preparar las células para el análisis, unas células de cultivos confluentes se despegaron empleando Accutase (ICN, Aurora, OH) y se plantaron en placas de 96 pozos con una densidad de 50,000 células por pozo. Después de la incubación durante la noche a 37°C, se extrajo el medio de crecimiento y las células se dejaron sin suero durante 30 - 60 min en un medio conteniendo 0.1% FBS. Para determinar la habilidad del OA-5D5 para inhibir la fosforilación cMet, la molécula se diluyó en serie de 200 a 0.19 nM en el medio + 0.1% FBS y se agregó a las placas de análisis. Después de una incubación de 15 min a 37°C, se añadió FCH (50 ng/ml). Luego las placas se incubaron durante 10 minutos más a 37°C, el medio se extrajo y se agregó una solución amortiguadora para la lisis de las células (Cell Signaling Technologies, Cat # 9803, Beverly, MA; complementado con un cóctel de inhibidor de proteasa obtenido en Calbiochem, Cat #539131, San Diego, CA). Los productos sometidos a lisis se analizaron en busca de c-Met fosforilado mediante un análisis de electroquimioluminiscencia empleando un instrumento BioVeris M-

Series (BioVeris International, Gaithersburg, MD). Se marcó un mAb anti-fosfotirosina (clon 4G10, Upstate, Lake Placid, NY) con BV-TAG mediante química NHS-éster de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioVeris). Se biotinilaron anticuerpos contra el dominio extracelular c-Met empleando biotina-X-NHS (Research Organics, Cleveland, OH). El BV-TAG-marcado 4G10 y el mAb anti-c-Met biotinilado se diluyeron en solución amortiguadora de análisis (PBS / 0.5% Tween-20 / 0.5% BSA) y se agregaron como un cóctel a los productos lisados de la célula. Después de una incubación de 1.5 - 2 hr a temperatura ambiente con agitación vigorosa, se agregaron glóbulos magnéticos de estreptavidina (Dynabeads, BioVeris). Después de una incubación final de 45 min, las placas se leyeron en el instrumento BioVeris.

Cultivo de células y análisis de proliferación

BaF3 es una célula linfocítica murina IL-3 dependiente que normalmente no expresa la cMet y no responde al FCH. Sin embargo, en BaF3-hMet derivado mediante la transfección con un cADN normal, de cadena larga para c-met humana (Schwall y colaboradores, J. Cell Biol. (1996), 133:709-718), el FCH estimula la proliferación y la supervivencia en ausencia de IL-3. En forma rutinaria, las células BaF3-hMet y BaF3-neo se pasaron por RPMI 1640, 5% suero fetal bovino, 4 µl/L β-mercaptoetanol, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml sulfato de estreptomicina, 2 mM L-glutamina y 5% WEHI-medio condicionado como una fuente de IL-3. Para medir la proliferación de HGF-dependiente, se cuantificó el número de células después de 3 días de tratamiento al agregar 25 µl Alarma Blue (Trek Diagnostic Systems; Cleveland, OH) y se midió la intensidad de la fluorescencia 6 horas más tarde. Los experimentos de control fueron estas células en ausencia del FCH. Células H358-PSF2 y HGF-PSF8 se pasaron por RPMI 1640, 10% suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml sulfato de estreptomicina, 2 mM L-glutamina. El medio de análisis fue RPMI 1640 más 0.1%, 0.5% BSA, o 10% FBS respectivamente. El análisis se realizó como se describió arriba.

Inmunoprecipitación e inmunotransferencia

Las células H358 son una estirpe celular derivada de carcinoma humano no microcítico de pulmón (NSCLC). Las células H358-PSF2, H358-PSF8 son células H358 humanas de FCH estables transfectadas (Tsao y colaboradores, Neoplasia, Vol.2, No.3, 2000) y se cultivaron en RPMI 1640, 10% suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml sulfato de estreptomicina, 2 mM L-glutamina. La detección de cMet tirosina fosforilación se efectuó esencialmente

como se describió arriba (Zioncheck, J Bio Chem, 270(28):16871-8, 1995). Brevemente, las células se llevaron a placas de 60-mm durante la noche y el medio se cambió a RPMI 1640 conteniendo 0.5% BSA, antes de agregar las combinaciones de, con o sin 1nM FCH o anticuerpo OA5D5 competidor.v2. Después de 10 min a 37°C, se extrajo el medio y las células se sometieron a lisis empleando una solución amortiguadora de lisis (150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1x cóctel de inhibidor de proteasa, 1X cóctel inhibidor de fosfatidasa (Sigma, St. Louis, MO)). Después de centrifugado, el supernadante del producto sometido a lisis se incubó con el anticuerpo policlonal anti-cMet IgG (c-28; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) se unió a la proteína G-Sefarosa durante 1 hora a 4 °C. Los inmunocomplejos se lavaron y se hirvieron a una solución amortiguadora de muestra 1x antes de la separación mediante SDS-PAGE y electrotransferencia a nitrocelulosa. Las proteínas que contenían fosfotirosina se visualizaron mediante un anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10; Upstate Biotechnology, Waltham, MA) seguido por conjugado HRP-cabra anti-ratón Fab (1:10,000; Jackson Labs, West Grove, PA) y en el caso de la cMet total, empleando el anticuerpo c-28 (1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) seguido por Fc-HRP cabra anti-conejo (1:10,000; Jackson Labs, West Grove, PA) con detección quimioluminiscente.

Estudio xenoinjerto de tumor

Unos ratones atímicos hembra se inocularon subcutáneamente con 5 millones de células de carcinoma pancreático KP4. Cuando los tumores alcanzaron 150-200 mm³, los ratones se distribuyeron en 2 grupos de 10. Se inyectó el grupo 1 en forma IP con un excipiente dos veces por semana. Se inyectó el grupo 2 en forma IP con OA5D5.v2, 30 mg/kg, dos veces por semana. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor sobrepasó dos veces el volumen del tumor de partida, o si el tumor se ulceró.

Resultados y discusión

Humanización de 5D5 - El soporte humano aceptor empleado para la humanización de 5D5 comprende el dominio VL de consenso humano kappa I y una variante del dominio VH de consenso subgrupo III. El dominio VH tiene 3 cambios de los consensos humanos: R71A, N73T y L78A. Los dominios VL y VH para el murino 5D5 se alinearon con los dominios humanos kappa I y subgrupo HJ; cada HVR se identificó y luego se injertó en el soporte humano aceptor para generar un injerto 5D5 que se podía representar como un Fab en fago. Cuando se

hicieron las pruebas del fago mostrando el injerto 5D5 para ver la unión HGFR-Fc inmobilizado, no se observó ninguna unión.

Se generó una biblioteca donde las regiones HVR del injerto 5D5 se seleccionaron mediante aleatorización restringida. Esta biblioteca se paneó contra HGFR-Fc inmobilizado durante 4 rondas de selección. Se escogieron los clones para el análisis de la secuencia de ADN y se observó que solamente se había seleccionado un solo clon. Este clon tenía un solo cambio en el dominio VH en la posición 94 (R94S) justo afuera de la región buscada como el HVR-H3 objetivo para la mutagénesis. El análisis de este clon mediante fago ELISA indicó que tenía una afinidad similar a la de la afinidad de murino 5D5 monovalente. Cuando se expresó como un Fab y se ensayó mediante Biacore, se determinó que Kd era 9.8 nM comparado con 8.3 nM para la afinidad de murino 5D5 monovalente. Por lo tanto, esta sustitución inesperada restaura la afinidad de unión completa al injerto 5D5 y el injerto 5D5 más R94S (hu5D5.vl) representan un anticuerpo totalmente humanizado. Es interesante notar que un aminoácido homólogo, la treonina, se encuentra en esta posición en el anticuerpo murino. MacCallum y colaboradores (*MacCallum y colaboradores J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) han analizado unas estructuras complejas de cristal del anticuerpo y del antígeno y encontraron que las posiciones 93 y 94 de la cadena pesada son parte de la región de contacto, por lo tanto parece razonable incluir estas posiciones en la definición de región hipervariable de H3 (HVR-H3) cuando se humanizan los anticuerpos.

Maduración de afinidad de hu5D5.vl – Para mejorar la afinidad de hu5D5.vl, se generaron 6 bibliotecas de muestrario de fagos en el entorno de hu5D5.vl, cada uno fijando como objetivo un solo HVR para una aleatorización restringida. Para evitar volver a seleccionar hu5D5.vl de un patrón de moléculas naturales potenciales de entorno alto, se introdujeron unos codones de parada en el HVR que se iba a mutar antes de generar cada biblioteca. Se empleó una solución de método de clasificación para aumentar el proceso de selección del fago basado en afinidad. Al manipular la concentración objetivo biotinilada, reduciendo el tiempo de captura fago a unos entornos menores y la adición de objetivo nobiotinilada para eliminar los clones con unas tasas de disociación (*off rates*) más rápidas, los clones de alta afinidad se pueden seleccionar en forma hábil. Lee y colaboradores, *supra*. Desde la primera ronda de selección, (captura de fago dependiente de objetivo) se observó un enriquecimiento sugiriendo la presencia de un gran número de clones en cada biblioteca con una afinidad

razonablemente alta para HGFR-Fc. El rigor de selección (consultar Métodos arriba) se aumentó en las rondas subsiguientes y en la ronda 3 las 6 bibliotecas se combinaron para generar un conjunto de una séptima biblioteca. Después de 4 rondas de selección, se analizaron los clones de los conjuntos de cada una de las 7 bibliotecas. Todos los clones en las bibliotecas fijando como objetivo HVR-L1 y HVR-L3 eran idénticos a hu5D5.v1; sin embargo, se observaron nuevas secuencias en las bibliotecas que fijaron como objetivo HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 (Figura 2). El conjunto de bibliotecas compuesto por la combinación de las 6 bibliotecas estaba dominado por secuencias de la biblioteca HVR-H3 sugiriendo que estas secuencias disponían la última mejora en afinidad para HGFR-Fc (Figura 3). Los clones seleccionados se cribaron mediante fago ELISA y luego se expresaron como proteína Fab y se determinó su afinidad empleando Biacore. Varios clones de la biblioteca combinada con cambios en HVR-H3 tenían afinidades mejoradas comparadas con hu5D5.v1 o la afinidad del murino 5D5 monovalente (Figura 4). Estos clones tenían bien sea S/T en la posición 94, o R/S en la posición 96 y T/S en la posición 100 y P/S/A en la posición 100a. El mejor clon, el clon 78 (hu5D5.v2) tenía 3 cambios de hu5D5.v1 (94T, 96R y 100T) y una mejoría en la afinidad 13 veces mayor.

Por lo tanto comenzando con el injerto en el 6 murino 5D5 HVRs en la construcción del aceptor humano, la expansión de HVR-H3 para incluir la posición 94 (Treonina) y la adición de 2 cambios en HVR-H3 conducen a un anticuerpo 5D5 totalmente humano, con una afinidad de unión 13 veces mejorada para HGFR. Adicionalmente, se ha determinado que los anticuerpos humanizados seleccionados descritos en la presente tienen por lo menos una actividad biológica comparable a la del anticuerpo progenitor 5D5, por ejemplo en el análisis de fosforilación del aceptor, etc. (no se muestran los datos).

Caracterización de un anticuerpo de la invención - Se caracterizaron los anticuerpos anti-Met "de un brazo" (a los cuales también se hace referencia como "un- brazo" y "OA"). Se efectuaron pruebas en dos anticuerpos de la invención. Específicamente, el anticuerpo "OA-5D5.v2" comprendía un Fab de un solo brazo que comprende secuencias de dominio variable como se representa en la Figura 13, donde el brazo Fab se fusionó a una región Fc y donde la región Fc era un complejo entre un Polipéptido Fc que comprende la secuencia Fc representada en la Figura 13 y un polipéptido Fc que comprende la secuencia Fc representada en la Figura 14. Los anticuerpos se caracterizaron como sigue:

- (1) En un análisis para verificar la estabilidad de OA-5D5.v2 para bloquear la unión del FCH a su aceptor, OA-5D5.v2 tuvo la capacidad de bloquear la unión de FCH a su aceptor por lo menos al igual que dos anticuerpos de comparación – a saber un anticuerpo quimérico de un brazo (que comprendía un brazo Fab del anticuerpo murino progenitor 5D5 (dominios variables representados en la Figura 7) fusionado a una región Fc humana) y otro anticuerpo de la invención (OA- 5D5.vl). Cuando se efectuaron pruebas en un rango de concentración del anticuerpo de alrededor de 3333 a 0.21 nM, bajo condiciones como se describe en la sección de Materiales y Métodos arriba, se encontró que OA-5D5.v2 tenía un valor IC50 que era menor a alrededor de la mitad del de un anticuerpo comparador como el anticuerpo quimérico de un brazo y OA- 5D5.vl. Notablemente, OA-5D5.vl bloqueó con un mejor IC50 que el anticuerpo quimérico de referencia. Consultar Figura 8.
- (2) En un análisis para verificar la estabilidad de OA-5D5.v2 para inhibir la activación del FCH aceptor, OA- 5D5.v2 tuvo la capacidad de inhibir la activación del receptor cinasa por lo menos igual que los dos anticuerpos comparadores como se describe en (1) arriba. Cuando se efectuaron pruebas en un rango de concentración del anticuerpo de alrededor de 200 a 0.19 nM, bajo las condiciones como se describen en la sección de Materiales y métodos arriba, se encontró que OA-5D5.v2 tenía un valor IC50 que era menor a alrededor de la mitad del de un anticuerpo comparador como el anticuerpo quimérico de un brazo y OA-5D5.vl. Consultar Fig. 9.
- (3) También se hicieron pruebas con OA-5D5.v2 para ver la unión entre especies humana, primate (mono de Java), canina y murina (ratón). Se encontró que OA-5D5.V2 se unió específicamente al aceptor humano y primate (mono cynomolgus) FCH aceptor, pero no canino ni murino (ratón), (no se muestran los datos.)
- (4) Se efectuaron pruebas con OA-5D5.v2 para conocer su habilidad para inhibir la proliferación celular en presencia de HGF. Como se muestra en la Figura 10, OA-5D5.v2 inhibió la proliferación celular por lo menos de la misma manera que su contraparte, el

anticuerpo quimérico y OA-5D5.v1 (como se describe en (1) arriba). Cuando se efectuaron pruebas en un rango de concentración del anticuerpo de alrededor de 0.01 a 100 nM, bajo las condiciones descritas en la sección Materiales y métodos arriba, se encontró que el OA-5D5.v2 tenía un valor IC₅₀ que era menor a alrededor de la mitad del de un anticuerpo comparador como el anticuerpo quimérico de un brazo y OA-5D5.v1. Consultar Fig. 10. Se confirmó la unión específica del OA-5D5.v2 a las células Met-transinfectadas mediante el análisis FACs. (No se muestran los datos)

- (5) Se efectuaron pruebas con OA-5D5.v2 para conocer su habilidad para inhibir la fosforilación del aceptor tirosina en presencia de HGF. Como se muestra en las Figuras HA y B, OA-5D5.v2 inhibió la fosforilación del aceptor tirosina cuando se efectuaron pruebas con concentraciones del anticuerpo desde alrededor de 10 a 1000 nM. Consultar Fig. 11A y B.
- (6) Se realizaron pruebas con OA-5D5.v2 para conocer la eficacia *in vivo* empleando un modelo de xenoinjerto de tumor con base en una estirpe celular de cáncer pancreático (KP4). Los resultados de este estudio de eficacia mostraron que el anticuerpo OA-5D5.v2 tenía la capacidad de inhibir y causar la regresión de los tumores *in vivo*. Como se muestra en la Fig. 12, se notó una pérdida total del tumor en la mayoría de los animales tratados con el anticuerpo.

LISTA PARCIAL DE REFERENCIAS

Angeloni, D., Danilkovitch-Miagkova, A., Miagkov, A., Leonard, E. J. y Lerman, M. I. (2003). The soluble sema domain of the Ron aceptor inhitsMSP-induced aceptor activation. J Biol Chem.

Antipenko, A., Himanen, J. P., van Leyen, K., Nardi-Dei, V., Lesniak, J., Barton, W. A., Rajashankar, K. R., Lu, M., Hoemme, C, Puschel, A. W. and Nikolov, D. B. (2003). Structure of the semaphorin- 3A receptor binding module. Neuron 39, 589-598.

Bardelli, A., Longati, P., Gramaglia, D., Stella, M. C and Comoglio, P. M. (1997). Gabl coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires la binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* 15, 3103-3111.

Bertotti, A. and Comoglio, P. M. (2003). Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the FCH receptor. *Trends Biochem Sci* 28, 527-533.

Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A. and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771.

Blechman, J. M., Lev, S., Barg, J., Eisenstein, M., Vaks, B., Vogel, Z., Givol, D. and Yarden, Y. (1995). The fourth immunoglobuline domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell* 80, 103-113.

Boix, L., Rosa, J. L., Ventura, F., Castells, A., Bruix, J., Rodes, J. and Bartrons, R. (1994). c-met mRNA overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 19, 88-91.

Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmiecik, T. E., Vande Woude, G. F. and Aaronson, S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-804.

Bussolino, F., Di Renzo, M. F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffey, A. and Comoglio, P. M. (1992). The hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119, 629-641.

Coltella, N., Manara, M. C, Cerisano, V., Trusolino, L., Di Renzo, M. F., Scotlandi, K., and Ferracini, R. (2003). Role of the MET/HGF receptor in proliferation and invasive behavior of osteosarcoma. *Faseb J* 17, 1162-1164.

Cooper, C. S., Park, M., Blair, D. G., Tainsky, M. A., Huebner, K., Croce, C. M., and Vande Woude, G. F. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311, 29-33.

Di Renzo, M. F., Olivero, M., Giacomini, A., Porte, H., Chastre, E., Mirossay, L., Nordlinger, B., Bretti, S., Bottardi, S., Giordano, S., and et al. (1995). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1, 147-154.

Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11, 507-517.

Furge, K. A., Zhang, Y. W., and Vande Woude, G. F. (2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19, 5582-5589.

Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., et al. (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110, 763- 773.

Gherardi, E., Youles, M. E., Miguel, R. N., Blundell, T. L., Iamele, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., and Butler, P. J. (2003). Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1032.

Giordano, S., Corso, S., Conrotto, P., Artigiani, S., Gilestro, G., Barberis, D., Tamagnone, L., and Comoglio, P. M. (2002). The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 4, 720-724.

Giordano, S., Di Renzo, M. F., Narsimhan, R. P., Cooper, C. S., Rosa, C, and Comoglio, P. M. (1989). Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* 4, 1383-1388.

Giordano, S., Maffe, A., Williams, T. A., Artigiani, S., Gual, P., Bardelli, A., Basilico, C., Michieli, P., and Comoglio, P. M. (2000). Different point mutations in the met oncogene elicit distinct biological properties. *Faseb J* 14, 399-406

Hamanoue, M., Takemoto, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., Nakajima, K., and Kohsaka, S. (1996). Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on central nervous system neurons in vitro. *J Neurosci Res* 43, 554-564.

Hartmann, G., Weidner, K. M., Schwarz, H., and Birchmeier, W. (1994). The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of Ras. *J Biol Chem* 269, 21936-21939.

Jeffers, M., Rong, S., and Vande Woude, G. F. (1996). Enhanced tumorigenicity and invasion- metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network. *Mol Cell Biol* 16, 1115-1125.

Jeffers, M., Schmidt, L., Nakaigawa, N., Webb, C. P., Weirich, G., Kishida, T., Zbar, B., and Vande Woude, G. F. (1997). Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11445-11450.

Jin, L., Fuchs, A., Schnitt, S. J., Yao, Y., Joseph, A., Lamszus, K., Park, M., Goldberg, I. D., and Rosen, E. M. (1997). Expression of scatter factor and c-met receptor in benign and malignant breast tissue. *Cancer* 79, 749-760.

Kuniyasu, H., Yasui, W., Yokozaki, H., Kitadai, Y., and Tahara, E. (1993). Aberrant expression of c- met mRNA in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 55, 72-75.

Lev, S., Yarden, Y., and Givol, D. (1992). A recombinant ectodomain of the receptor for the stem cell factor (SCF) retains ligand-induced receptor dimerization and antagonizes SCF-stimulated cellular responses. *J Biol Chem* 267, 10866-10873.

Liu, C, Park, M., and Tsao, M. S. (1992). Overexpression of c-met proto-oncogene but not epidermal growth factor receptor or c-erbB-2 in primary human colorectal carcinomas. *Oncogene* 7, 181-185.

Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., and Godowski, P. J. (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *Embo J* 11, 2503-2510.

Lorenzato, A., Olivero, M., Patane, S., Rosso, E., Oliaro, A., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (2002). Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer Res* 62, 7025-7030.

Love, C. A., Harlos, K., Mavaddat, N., Davis, S. J., Stuart, D. I, Jones, E. Y., and Esnouf, R. M. (2003). The ligand-binding face of the semaphorins revealed by the high-resolution crystal structure of SEMA4D. *Nat Struct Biol* 10, 843-848.

Maina, F., Casagrande, F., Audero, E., Simeone, A., Comoglio, P. M., Klein, R., and Ponzetto, C. (1996). Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87, 531-542.

Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1993). Roles of HGF as a pleiotropic factor in organ regeneration. *Exs* 65, 225-249.

Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P. C, Morrison, P. T., and Salgia, R. (2002). Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 41-59.

Meiners, S., Brinkmann, V., Naundorf, H., and Birchmeier, W. (1998). Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells. *Oncogene* 16, 9-20.

Morello, S., Olivero, M., Aimetti, M., Bernardi, M., Berrone, S., Di Renzo, M. F., and Giordano, S. (2001). MET receptor is overexpressed but not mutated in oral squamous cell carcinomas. *J Cell Physiol* 189, 285-290.

Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T., and Kidamura, N. (1992). Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J Biol Chem* 267, 20114-20119.

Naldini, L., Weidner, K. M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C, Narsimhan, R. P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K., and et al. (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *Embo J* 10, 2867-2878.

Natali, P. G., Prat, M., Nicotra, M. R., Bigotti, A., Olivero, M., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (1996). Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 69, 212-217.

Nguyen, L., Holgado-Madruga, M., Maroun, C, Fixman, E. D., Kamikura, D., Fournier, T., Charest, A., Tremblay, M. L., Wong, A. J., and Park, M. (1997). Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J Biol Chem* 272, 20811-20819.

Nusrat, A., Parkos, C. A., Bacarra, A. E., Godowski, P. J., Delp-Archer, C, Rosen, E. M., and Madara, J. L. (1994). Hepatocyte growth factor/scatter factor effects on epithelia. Regulation of intercellular junctions in transformed and nontransformed cell lines, basolateral polarization of c-met receptor in transformed and natural intestinal epithelia, and induction of rapid wound repair in a transformed model epithelium. *J Clin Invest* 93, 2056-2065.

Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775-787.

Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C, Pennacchietti, S., Nicotra, M. R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P. G., et al. (1996). Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 74, 1862-1868.

Olivero, M., Valente, G., Bardelli, A., Longati, P., Ferrero, N., Cracco, C, Terrone, C, Rocca- Rossetti, S., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (1999). Novel mutation in the ATP-binding site of the MET oncogene tyrosine kinase in a HPRCC family. *Int J Cancer* 82, 640-643.

Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J. P., Herrlich, P., and Ponta, H. (2002). CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 16, 3074-3086.

Park, M., Dean, M., Cooper, C. S., Schmidt, M., O'Brien, S. J., Blair, D. G., and Vande Woude, G. F. (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 45, 895-904.

Peek, M., Moran, P., Mendoza, N., Wickramasinghe, D., and Kirchhofer, D. (2002). Unusual proteolytic activation of pro-hepatocyte growth factor by plasma kallikrein and coagulation factor XIa. *J Biol Chem* 277, 47804-47809.

Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C, Pelicci, P. G., and et al. (1995). The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the She adaptor protein. *Oncogene* 10, 1631-1638.

Plotnikov, A. N., Schlessinger, J., Hubbard, S. R., and Mohammadi, M. (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98, 641-650.

Ponzetto, C, Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P. M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261-271.

Ponzetto, C, Zhen, Z., Audero, E., Maina, F., Bardelli, A., Basile, M. L., Giordano, S., Narsimhan, R., and Comoglio, P. (1996). Specific uncoupling of GRB2 from the Met receptor. Differential effects on transformation and motility. *J Biol Chem* 271, 14119-14123.

229
241

Robertson, S. C, Tynan, J. A., and Donoghue, D. J. (2000). RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad. *Trends Genet* 16, 265-271.

Royal, I, and Park, M. (1995). Hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 270, 27780-27787.

Schmidt, C, Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.

Schmidt, L., Dull, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, L, Dean, M., et al. (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 16, 68-73.

Schmidt, L., Junker, K., Nakaigawa, N., Kinjerski, T., Weirich, G., Miller, M., Lubensky, L, Neumann, H. P., Brauch, H., Decker, J., et al. (1999). Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 18, 2343-2350.

Suzuki, K., Hayashi, N., Yamada, Y., Yoshihara, H., Miyamoto, Y., Ito, Y., Ito, T., Katayama, K., Sasaki, Y., Ito, A., and et al. (1994). Expression of the c-met protooncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 20, 1231-1236.

Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G. L, Song, H., Chedotal, A., Winberg, M. L., Goodman, C. S., Poo, M., et al. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71-80.

Tempest, P. R., Stratton, M. R., and Cooper, C. S. (1988). Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumour cell lines. *Br J Cancer* 58, 3-7.

~~240~~
242

Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2001). A signaling adapter function for $\alpha 6 \beta 4$ integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107, 643-654.

Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-705.

Van Vactor, D. V., and Lorenz, L. J. (1999). Neural development: The semantics of axon guidance. *Curr Biol* 9, R201-204.

Weidner, K. M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., and Birchmeier, W. (1996). Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384, 173-176.

Wiesmann, C, Fuh, G., Christinger, H. W., Eigenbrot, C, Wells, J. A., and de Vos, A. M. (1997). Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 91, 695-704.

Wiesmann, C, Ultsch, M. H., Bass, S. H., and de Vos, A. M. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 401, 184-188.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-c-met que comprende:
 - (a) por lo menos una secuencia HVR seleccionada entre el grupo conformado por:
 - (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A17, donde A1-A17 es KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID No: 1)
 - (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B 1-B7, donde B 1-B7 es WASTRES (SEQ ID No:2)
 - (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QQYYAYPWT (SEQ ID No:3)
 - (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWLH (SEQ ID No:4)
 - (v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID No:5)
 - (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F11, donde F1-F11 es XYGSYVSPLDY (SEQ ID No:6) y X no es R; y
 - (b) por lo menos una variante HVR, donde la variante HVR comprende la modificación de por lo menos un residuo de la secuencia representada en SEQ ID No: 1, 2, 3, 4, 5 o 6.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde F1 en una variante HVR-H3 es T o S, F3 es R o S y F7 es T.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es humanizado.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde por lo menos una porción de la secuencia de soporte es una secuencia de soporte humano consensual.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la citada modificación es una sustitución, una inserción o una eliminación.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde una variante HVR-L2 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes

posiciones: B 1 (M o L), B2 (P, T, G o S), B3 (N, G, R o T), B4 (I, N o F), B5 (P, I, L o G), B6 (A, D, T o V) y B7 (R, I, M o G).

7. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde una variante HVR-H1 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: D3 (N, P, L, S, A, I), D5 (I, S o Y), D6 (G, D, T, K, R), D7 (F, H, R, S, T o V) y D9 (M o V).
8. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde una variante HVR-H2 comprende 1-4 (1, 2, 3 o 4) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E7 (Y), E9 (I), E10 (I), E14 (T o Q), E15 (D, K, S, T o V), E16 (L), E17 (E, H, N o D) y E18 (Y, E o H).
9. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde una variante HVR-H3 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: F1 (T, S), F3 (R, S, H, T, A, K), F4 (G), F6 (R, F, M, T, E, K, A, L, W), F7 (L, I, T, R, K, V), F8 (S, A), F10 (Y, N) y F11 (Q, S, H, F).
10. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende un HVR-L1 teniendo la secuencia de SEQ ID No: 1.
11. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende un HVR-L3 teniendo la secuencia de SEQ ID No:3.
12. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde F1 en una variante HVR-H3 es T.
13. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde F3 en una variante HVR-H3 es R o S.
14. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde F7 en una variante HVR-H3 es T.
15. Un anticuerpo humanizado anti-c-met donde la afinidad del anticuerpo monovalente a la c- met humana es sustancialmente igual a la afinidad de un anticuerpo monovalente murino que comprende una secuencia variable de cadena liviana y de cadena pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10).
16. Un anticuerpo humanizado anti-c-met donde la afinidad del anticuerpo monovalente a la c- met humana es por lo menos 3 veces mayor que la afinidad de un anticuerpo monovalente murino que comprende una secuencia variable de cadena liviana y de cadena pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10).
17. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 15 o 16 donde el anticuerpo murino es producido por una estirpe celular de hibridomas depositadas bajo

247
245

la Colección Americana de Cultivos de Tipo, Número de Acceso ATCC con designación HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6).

18. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 15-17 donde la afinidad de unión se expresa como un valor K_d .
19. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 15-18 donde la afinidad de unión se mide por medio de Biacore o radioinmunoanálisis.
20. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de soporte consensual humano K subgrupo 1.
21. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de soporte consensual subgrupo humano III de cadena pesada.
22. El anticuerpo de la reivindicación 21 donde la secuencia de soporte comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78.
23. El anticuerpo de la reivindicación 22 donde la citada sustitución es R7 IA, N73T y/o N78A.
24. Un anticuerpo humanizado anti-c-met donde el anticuerpo humanizado inhibe la unión del factor de crecimiento hepatocítico humano a su receptor mejor que un anticuerpo de referencia que comprende un anticuerpo anti-c-met quimérico que comprende una secuencia variable de cadena liviana y de cadena pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10).
25. El anticuerpo de la reivindicación 24, donde el anticuerpo humanizado inhibe la unión con un valor IC_{50} que es menos de la mitad del que corresponde al anticuerpo quimérico.
26. El anticuerpo de la reivindicación 25, donde el IC_{50} se determina en un rango de concentración del anticuerpo desde alrededor de 0.01 nM a alrededor de 1000 nM.
27. Un anticuerpo humanizado anti-c-met donde el anticuerpo humanizado inhibe la aceptación del receptor del factor de crecimiento hepatocítico humano (HGF) mejor que un anticuerpo de referencia que comprende un anticuerpo anti-c-met quimérico que comprende una secuencia variable de cadena liviana y de cadena pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10).
28. El anticuerpo de la reivindicación 27, donde el anticuerpo humanizado inhibe la activación del receptor con un valor IC_{50} que es menos de la mitad del que corresponde al anticuerpo quimérico.

249
246

29. El anticuerpo de la reivindicación 28, donde el IC50 se determina en un rango de concentración del anticuerpo desde alrededor de 0.1 nM hasta alrededor de 100 nM.
30. Un anticuerpo humanizado anti-c-met donde el anticuerpo humanizado inhibe la proliferación celular c-met-dependiente mejor que un anticuerpo de referencia que comprende un anticuerpo anti-c-met quimérico que comprende una secuencia variable de cadena liviana y de cadena pesada como se representa en la Fig. 7 (SEQ ID No: 9 y 10).
31. El anticuerpo de la reivindicación 30, donde el anticuerpo humanizado inhibe la proliferación celular con un valor IC50 que es menos de la mitad del que corresponde al anticuerpo quimérico.
32. El anticuerpo de la reivindicación 31, donde el IC50 se determina en un rango de concentración del anticuerpo desde alrededor de 0.01 nM hasta alrededor de 100 nM.
33. El anticuerpo de las reivindicaciones anteriores, donde tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico son monovalentes.
34. El anticuerpo de las reivindicaciones anteriores, donde tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico comprenden una sola región Fab unida a una región Fc.
35. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC representada en la Figura 13 (SEQ ID No: 191-193).
36. El anticuerpo de la reivindicación 35, donde el dominio variable comprende una secuencia FR1-HC, FR2-HC, FR3- HC y/o FR4-HC representada en la Figura 13 (SEQ ID No: 187-190).
37. El anticuerpo de la reivindicación 35 o 36, donde el anticuerpo comprende una secuencia CH1 y/o Fc representada en la Figura 13 (SEQ ID No: 194 y/o 195).
38. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende una secuencia HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC representada en la Figura 13 (SEQ ID No: 183-185).
39. El anticuerpo de la reivindicación 38, donde el dominio variable comprende una secuencia FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC representada en la Figura 13 (SEQ ID No: 179-182).
40. El anticuerpo de la reivindicación 38 o 39, donde el anticuerpo comprende una secuencia CL1 representada en la Figura 13 (SEQ ID No: 186).

41. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 35-37 y un dominio variable de cadena liviana de cualquiera de las reivindicaciones 38-40.
42. El anticuerpo de la reivindicación 41, donde el anticuerpo es monovalente y comprende una región Fc.
43. El anticuerpo de la reivindicación 42, donde la región Fc comprende un primer y un segundo polipéptido, donde el primer y el segundo polipéptido comprende cada uno una o varias mutaciones con respecto al tipo humano Fc natural.
44. El anticuerpo de la reivindicación 43, donde el primer polipéptido comprende la secuencia Fc representada en la Figura 13 (SEQ ID No: 195) y el segundo polipéptido comprende la secuencia representada en la Figura 14 (SEQ ID No: 196).
45. Un método para inhibir la proliferación celular activada por c-met, el citado método que comprende poner en contacto una célula o un tejido con una cantidad efectiva de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
46. Un método para modular una enfermedad asociada a la desregulación del eje de señalización FCH/c-met, el citado método que comprende administrar a un individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
47. Un método para tratar un individuo teniendo cáncer, el citado método que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
48. El método de la reivindicación 47, donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer colorrectal cáncer y/o cáncer pancreático.
49. Un método para tratar un desorden proliferativo en un individuo, el citado método que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
50. El método de la reivindicación 49, donde el desorden proliferativo es cáncer.
51. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-44.
52. Una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 51.

~~247~~
248

53. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-44.
54. Una composición de la reivindicación 53, donde la composición comprende un excipiente.

[illegible]

251

Figure 4

														SDS Variantes		Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	
L2																			
I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	SEQ ID NO:164								
I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	SEQ ID NO:165	#34	4.87E+04	3.52E-04	7.22				
H1																			
A	S	G	Y	T	F	T	S	S	W	L	H	W	V	SEQ ID NO:166					
A	S	G	Y	T	F	T	S	S	W	L	H	W	V	SEQ ID NO:167	#94	1.18E+04	4.50E-04	38.1	
H2																			
W	V	G	M	I	D	P	S	N	S	D	T	R	I	F	N	F	D	R	F
W	V	G	M	I	D	P	S	N	S	D	T	R	I	F	N	F	D	R	F
W	V	G	M	I	D	P	S	N	S	D	T	R	I	F	N	F	D	R	F
SQ ID Nos:168-170														#4	6.30E+04	4.92E-04	7.81		
														#12	5.98E+04	5.06E-04	8.46		
H3																			
C	A	R	D	G	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO:171	injerio	no se detecta unión a 500 nM		
C	A	R	D	G	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO:172	R94S	5.16E+04	5.07E-04	9.83
C	A	R	D	G	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO:173	OA-SD5	8.98E+04	7.43E-04	8.27
C	A	T	Y	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO:174	#49	2.86E+03	2.24E-04	78.3	
C	A	T	Y	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO:175	#92	1.99E+05	2.09E-04	1.05	
C	A	T	Y	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO:176	#78	2.36E+05	1.47E-04	0.625	
C	A	T	Y	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO:177	#75	8.31E+04	1.58E-04	1.9	
C	A	T	Y	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO:178	#95	9.05E+04	2.29E-04	2.53	

WO 2006/015371

4/17

PCVUS2005/027626

252 258

FIG. 5A

I
A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
B QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
C QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
D QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
WVRQAPGQGLEWMG
WVRQAPGQGLEWM
WVRQAPGQGLEWM
WVRQAPGQGLEWM
II
A QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTICTVSGGSYS
B QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTICTVSGGSYS
C QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTICTVSGGSYS
D QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTICTVSGGSYS
WIRQPPGKGLEWIG
WIRQPPGKGLEWI
WIRQPPGKGLEWI
WIRQPPGKGLEWI
III
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTES
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTES
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTES
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTES
WVRQAPGKGLEWVS
WVRQAPGKGLEWV
WVRQAPGKGLEWV
WVRQAPGKGLEWV
S17
Aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
WVRQAPGKGLEWVS
WVRQAPGKGLEWV
WVRQAPGKGLEWV
Segundo Aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
WVRQAPGKGLEWVS
WVRQAPGKGLEWV
WVRQAPGKGLEWV
WVRQAPGKGLEWV

WO 2006/013171

S17

PCVUS2005/02/16/26

253 27

FIG. 5B

RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:19
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:20
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:21
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:22
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:23
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:24
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:25
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:26
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:27
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:28
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:29
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:30
RFTISD SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:31
RFTISD SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:32
RFTISD SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:33
RFTISD SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:34
RFTISD SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:35
RFTISD SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:36
RFTISD SKNTLYLQMNSLRAEDYAVYYCAR	WGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO.:37

WO 2006/015171

6/17

PCT/US2005/027026

254
252

NO 2006/01571
7/17
PCVUS0005/02/026

KV1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC[REDACTED]WYQQKPGKAPKLLIY[REDACTED]GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ[REDACTED]
KV2 DIVMTQSPPLSLPVTGPGEPAISCS[REDACTED]WYLQKPGQSPQLLIY[REDACTED]GVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVE[REDACTED]
KV3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC[REDACTED]WYQQKPGQAPRLIY[REDACTED]GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE[REDACTED]
KV4 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC[REDACTED]WYQQKPGQPPKLLIY[REDACTED]GVPDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQ[REDACTED]

FIG. 6A

255

EDFATYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO: 38
EDVGYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO: 39
EDFAVYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO: 40
EDVAVYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO: 41

W02006/03371

8/17

ICT/US2005/027026

FIG. 6B

256
257

LC		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	a	b	c	d	e	f	
Kabat#		D	I	M	M	S	Q	S	P	S	S	L	T	V	S	V	G	E	K	V	T	V	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	Y	T	S	
muSD5		28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
		S	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R
		62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93		
		F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	V	K	A	D	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	A		
		94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	(SEQ ID NO:9)																		
		Y	P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R																			

HC		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Kabat#		Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	M	S	C	R	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W
muSD5		34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
		L	H	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	M	I	D	P	S	N	S	D	T	R	F	N	P	N	F	K	D
		66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	63	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
		K	A	T	L	N	V	D	R	S	S	N	T	A	Y	M	L	L	S	S	L	T	S	A	D	S	A	V	Y	C	A	T	Y	
		96	97	98	99	100	a	k	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	(SEQ ID NO:10)												
		G	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S													

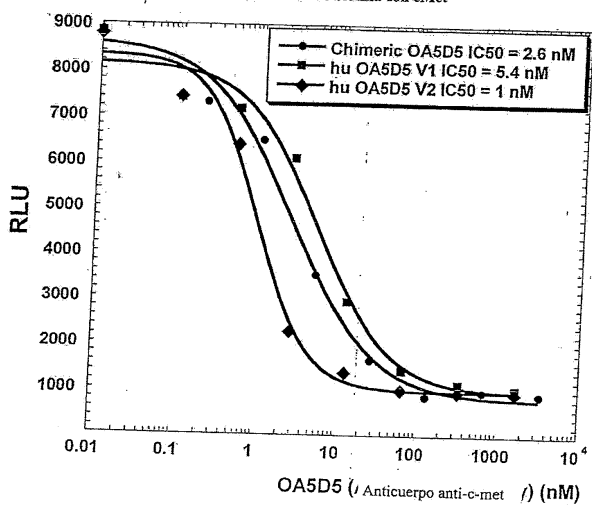
FIG. 7

257

257

FIG._8

Inhibición de HGF/ Punto de Unión de cMET
Inhibición de la fijación de 2.5 nM HGF-marcador
en solución a 5 nM de biotina con cMet



WO 2006/013371

10/17

PC27US2006/013371

258 258

257
254

Listado de Secuencias

<110> Genentech, Inc.
Dennis, Mark S.
Billeci, Karen
Young, Judy
Zheng, Zhong

<120> ANTAGONISTAS ANTI-CMET HUMANIZADOS

<130> P2138R1 PCT

<140> PCT/US2005/027626

<141> 2005-08-04

<150> US 60/598,991

<151> 2004-08-05

<160> 196

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 1

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ser	Ser	Gln	Lys	Asn	Tyr
1				5					10					15

Leu Ala

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 2

Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser
				5		

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

258
260

<400> 3
Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 4
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 5
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn
1 5 10 15
Phe Lys Asp

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<220>
<221> Unsure
<222> 1
<223> X is any amino acid except R

<400> 6
Xaa Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

259
261

<400> 7
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 8
Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 9
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9
Asp Ile Met Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Val
1 5 10 15
Gly Glu Lys Val Thr Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30
Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Lys Ala Asp Asp Leu Ala
80 85 90
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly
95 100 105
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
110

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

268
262

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Trp Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe
50 55 60
Asn Pro Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Asn Val Asp Arg Ser
65 70 75
Ser Asn Thr Ala Tyr Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp
80 85 90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro
95 100 105
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
110 115
<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Se sintetiza la secuencia
<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
20 25 30
Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

261
263

<210> 12
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30
Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60
Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
80 85 90
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly
95 100 105
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 13
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser

262
269

65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110
<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Se sintetiza la secuencia
<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe
50 55 60
Asn Pro Asn Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro
95 100 105
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115
<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Leu Asp Ala Gln Thr
5
<210> 16
<211> 9

265

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Leu Thr Glu Lys Arg Lys Lys Arg Ser
5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Met
5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Asn Val Arg Cys Leu Gln His Phe
5

<210> 19
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg
35 40 45
Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
50 55 60
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 20
<211> 81
<212> PRT

264
265

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 21

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 22

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

268
267

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 23

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
35 40 45
Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
50 55 60
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 24

<211> 81

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

268
268

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 25

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 26

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

267
269

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 27

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 28

<211> 81

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

268
270

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 29

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 30

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

261
271

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 31

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 32

<211> 81

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 32

278
272

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 33
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 34
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

221
273

1	5	10	15											
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys
		20							25					30
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg
			35						40					45
Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln
				50					55					60
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				65					70					75
Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
				80					85					

<210> 35
<211> 81
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 36
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

~~274~~
274

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 37
<211> 79
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 38
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 38
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

275

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 39
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 39
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15
Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
50 55 60
Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 40
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 40
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

~~274~~
276

20	25	30
Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly	Ile Pro Asp Arg Phe Ser	
35	40	45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser Arg Leu	
50	55	60
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr	Cys Phe Gly Gln Gly Thr	
65	70	75
Lys Val Glu Ile Lys		
80		

<210> 41
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 41
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 42
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

275
277

<210> 43
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 43
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 44
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 44
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 45
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 46
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 46
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

276
278

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 47
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 48
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30
Tyr Cys

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 49
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 50
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<220>
<221> Xaa
<222> 6
<223> Xaa is A or R

~~277~~
279

<220>
<221> Xaa
<222> 8
<223> Xaa is T or N

<220>
<221> Xaa
<222> 13
<223> Xaa is A or L

<400> 50
Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 51
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 51
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 52
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 52
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 53
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

278
280

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 53
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30
Ala Arg

<210> 54
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 54
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30
Ser

<210> 55
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 55
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30
Ser Arg

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

271
281

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 56

Trp Ala Ser Thr Pro Ala Ser
5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 57

Trp Ala Ser Ile Arg Asp Arg
5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 58

Met Pro Asn Thr Arg Asp Ser
5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 59

Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ile
5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 60

Trp Ala Gly Ile Arg Glu Met
5

<210> 61

288
282

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 61
Leu Ala Ser Asn Arg Glu Gly
5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 62
Trp Thr Gly Asn Arg Glu Met
5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 63
Trp Ala Arg Thr Arg Glu Ser
5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 64
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

281
283

<400> 65
Trp Ala Ser Thr Pro Glu Ser
5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<220>
<221> Unsure
<222> 4
<223> Unknown amino acid

<400> 66
Trp Ala Ser Xaa Arg Glu Ser
5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 67
Trp Ala Ser Asn Ile Thr Ser
5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 68
Trp Ala Asn Phe Arg Val Ser
5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 69
Trp Thr Ser Asn Arg Val Ser

284

5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 70
Leu Gly Gly Thr Arg Val Ser
5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 71
Leu Ala Thr Thr Arg Val Ser
5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 72
Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser
5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 73
Trp Ala Ser Thr Leu Val Ser
5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

287
285

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 74
Trp Ala Ser Thr Gly Val Gly
5

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 75
Trp Ser Ser Thr Arg Val Ser
5

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 76
Gly Tyr Asn Phe Ile Gly Phe Trp Met His
5 10

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 77
Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Phe Trp Leu His
5 10

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 78
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Trp Leu His
5 10

284
286

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 79
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp Leu His
5 10

<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 80
Gly Tyr Pro Phe Thr Thr Arg Trp Leu His
5 10

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 81
Gly Tyr Leu Phe Thr Ser Ser Trp Leu His
5 10

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 82
Gly Tyr Asn Phe Ser Ser Ser Trp Leu His
5 10

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

285
287

<400> 83
Gly Tyr Pro Phe Thr Lys Ser Trp Leu His
5 10

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 84
Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Ser Trp Val His
5 10

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 85
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Trp Leu His
5 10

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 86
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp Leu His
5 10

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 87
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Leu His
5 10

<210> 88
<211> 10

286
288

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 88
Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Thr Trp Leu His
5 10

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 89
Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Val Trp Leu His
5 10

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 90
Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Val Trp Leu His
5 10

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 91
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Val Trp Leu His
5 10

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 92

287
289

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Val Trp Leu His
5 10

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 93
Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 94
Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 95
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 96
Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 97
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 97

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Ile Arg Phe Asn Pro Asp
1 5 10 15

Phe Glu Asp

<210> 98

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 98

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Thr Lys
1 5 10 15

Phe Glu Asp

<210> 99

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 99

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Lys
1 5 10 15

Phe His Asp

<210> 100

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 100

Gly Met Ile Asp Pro Ser Tyr Ser Ile Thr Arg Phe Asn Pro Lys
1 5 10 15

Phe Lys Tyr

289
291

<210> 101
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 101
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Lys
1 5 10 15

Phe Asn Tyr

<210> 102
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 102
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Lys
1 5 10 15

Phe Asn Asp

<210> 103
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 103
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Lys
1 5 10 15

Phe Asn Glu

<210> 104
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 104

290
292

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn
1 5 10 15

Phe Asp Asp

<210> 105
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 105
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn
1 5 10 15

Phe Glu Asp

<210> 106
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 106
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Gln Asn
1 5 10 15

Phe Glu Asp

<210> 107
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 107
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn
1 5 10 15

Phe Glu His

<210> 108
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

291
293

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 108

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn
1 5 10 15

Phe Lys Glu

<210> 109

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 109

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn
1 5 10 15

Leu Gln Asp

<210> 110

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 110

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Ser
1 5 10 15

Leu Glu Asp

<210> 111

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 111

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Thr
1 5 10 15

Phe Glu Asp

29T

294

<210> 112
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 112
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Val
1 5 10 15

Leu Lys Asp

<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 113
Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 114
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 114
Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 115
Ser Tyr Arg Ser Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 116
<211> 11
<212> PRT

293
295

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 116

Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 117

Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Gln
5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 118

Ser Tyr Arg Ser Tyr Phe Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 119

Ser Tyr Ser Ser Tyr Met Arg Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 120

Ser Tyr Ser Ser Tyr Thr Arg Pro Leu Asp Tyr

294
296

5 10

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 121
Ser Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ser Leu Asp Tyr
5 10

<210> 122
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 122
Thr Tyr Gly Ser Tyr Glu Lys Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 123
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 123
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Lys Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 124
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Arg Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 125
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

295
297

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 125
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 126
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 126
Thr Tyr His Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 127
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 127
Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 128
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 128
Thr Tyr Arg Ser Tyr Lys Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 129
Thr Tyr Arg Ser Tyr Phe Thr Pro Leu Tyr Tyr
5 10

246
298

<210> 130
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 130
Thr Tyr Arg Gly Tyr Glu Thr Pro Leu Asp Tyr
 5 10

<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 131
Thr Tyr Arg Ser Tyr Phe Val Pro Leu Asp Tyr
 5 10

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 132
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Lys Pro Leu Asp Tyr
 5 10

<210> 133
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 133
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Arg Pro Leu Asp Tyr
 5 10

<210> 134
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

~~297~~
299

<400> 134
Thr Tyr Ser Ser Tyr Met Arg Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 135
Thr Tyr Ser Ser Tyr Met Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 136
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 136
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp Tyr
5 10

<210> 137
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 137
Thr Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr Ala Leu Asp Tyr
5 10

<210> 138
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 138
Thr Tyr Thr Ser Tyr Arg Leu Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 139
<211> 7

298
300

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 139
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
5

<210> 140
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 140
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 141
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 141
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn
1 5 10 15
Phe Lys Asp

<210> 142
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 142
Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

249
301

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 143

Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 144

Ser Tyr Arg Ser Tyr Arg Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 145

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 145

Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 146

Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Val Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 147

Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Val Pro Leu Asp Ser
5 10

<210> 148

300
302

<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 148
Ser Tyr Ser Ser Tyr Val Lys Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 149
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 149
Ser Tyr Ser Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 150
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 150
Thr Tyr Ala Ser Tyr Ala Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 151
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 151
Thr Tyr Ala Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 152
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

303

<400> 152
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp Tyr
5 10

<210> 153
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 153
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp His
5 10

<210> 154
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 154
Thr Tyr Gly Ser Tyr Met Val Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 155
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 155
Thr Tyr His Ser Tyr Leu Val Pro Leu Asn Tyr
5 10

<210> 156
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 156
Thr Tyr Lys Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 157
<211> 11
<212> PRT

309
309

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 157

Thr Tyr Arg Ser Tyr Arg Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 158

Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Phe
5 10

<210> 159

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 159

Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 160

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 160

Thr Tyr Ser Ser Tyr Trp Ile Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 161

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 161

Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Arg Pro Leu Asp Tyr

303
305

5 10

<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 162
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ser Leu Asp Tyr
5 10

<210> 163
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 163
Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp Tyr
5 10

<210> 164
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 164
Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
5 10

<210> 165
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 165
Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val
5 10

<210> 166
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

7104
306

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 166

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His Trp Val
5 10

<210> 167

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 167

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Leu His Trp Val
5 10

<210> 168

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 168

Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn
1 5 10 15

Pro Asn Phe Lys Asp Arg Phe
20

<210> 169

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 169

Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn
1 5 10 15

Thr Lys Phe Glu Asp Arg Phe
20

<210> 170

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

305
307

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 170

Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn
1 5 10 15

Pro Asn Phe Glu Asp Arg Phe
20

<210> 171

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 171

Cys Ala Arg Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 172

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 172

Cys Ala Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 173

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 173

Cys Ala Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 174

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 174

Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly

~~306~~
308

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 175
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 175
Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 176
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 176
Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 177
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 177
Cys Ala Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 178
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 178
Cys Ala Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Thr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 179
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

207
309

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 179

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
							20

<210> 180

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 180

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 181

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 181

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 182

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 182

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				5					10	

<210> 183

<211> 17

<212> PRT

208
310

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 183

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 184

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 184

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
5

<210> 185

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 185

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
5

<210> 186

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 186

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
35 40 45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser

309
311

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

Cys

<210> 187
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 187
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 188
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 188
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 189
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 189
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

310
312

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 190
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 191
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 191
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 192
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 192
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn
1 5 10 15

Phe Lys Asp

<210> 193
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 193
Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 194
<211> 108
<212> PRT

311
313

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 194

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	
1				5					10					15	
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	
				20					25					30	
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	
				35					40					45	
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				50					55					60	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
				65					70					75	
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
				80					85					90	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
				95					100					105	
Thr	His	Thr													

<210> 195

<211> 222

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 195

Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
1				5					10					15	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				20					25					30	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				35					40					45	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				50					55					60	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
				65					70					75	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	

312
314

80	85	90
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
95	100	105
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
110	115	120
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
125	130	135
Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
140	145	150
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
155	160	165
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
170	175	180
Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
185	190	195
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
200	205	210
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
215	220	

<210> 196
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza la secuencia

<400> 196

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
1	5	10
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
20	25	30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
35	40	45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
50	55	60
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
65	70	75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
80	85	90

317
315

Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
				95					100					105	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
				110					115					120	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
				125					130					135	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
				140					145					150	
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
				155					160					165	
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
				170					175					180	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
				185					190					195	
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
				200					205					210	
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
				215					220						

314
316

AS: 102916
(12)

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned
Karen BILLECI
Judy YOUNG
Zhong ZHENG

acting as Inventors
of Colombian Patent Appln. No. 07012.528
Entitled: **HUMANIZED ANTI-CMET**
ANTAGONISTS

with domiciles in:
5247 Shelter Creek Lane
San Bruno, California 94066 USA

2833 Tramanto Drive
San Carlos, California 94070 USA

1175 Balclutha Drive
Foster City, California 94404 USA

hereby declare(s) that they(he) assigns all
rights of ownership as well as all rights and
privileges relating thereto without exception over
the following patent application in Colombia:

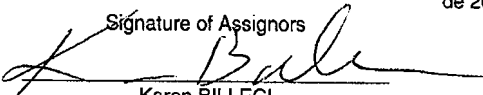
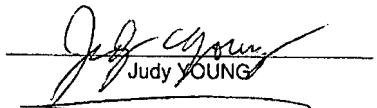
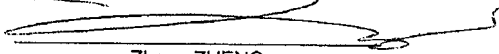
Colombian Patent Appln. No. 07012.528
Entitled: **HUMANIZED ANTI-CMET**
ANTAGONISTS

to GENENTECH, INC.

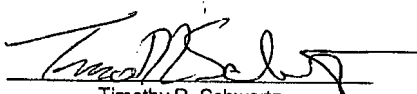
domiciled in 1DNA Way, South San Francisco,
CA 94080-4990., USA.

The assignors and the assignee sign this
document as proof of their acceptance of the
assignment.

Given and signed on the 5th day of March of
2007

Signature of Assignors

Karen BILLECI

Judy YOUNG

Zhong ZHENG

Given and signed on the 5th day of March of
2007

Signature of Assignee

Timothy R. Schwartz
Associate General Counsel – Director
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

CESION

Los Suscritos
Karen BILLECI
Judy YOUNG
Zhong ZHENG

en calidad de Inventor
de la Sol. de Patente Colombiana No.
07012.528
Titulada: **HUMANIZED ANTI-CMET**
ANTAGONISTS

con domicilios en
5247 Shelter Creek Lane
San Bruno, California 94066 EUA

2833 Tramanto Drive
San Carlos, California 94070 EUA

1175 Balclutha Drive
Foster City, California 94404 EUA

declara por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que le
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de
patente en Colombia:

Sol. de Patente Colombiana No. 07012.528
Titulada: **HUMANIZED ANTI-CMET**
ANTAGONISTS

a GENENTECH, INC.

domiciliada en 1 DNA Way, South San
Francisco, CA 94080-4990., EUA.

El cedente y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de la
cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 2007

Firma del Cedente

Firma del Cesionario

(see attached California
All-Purpose acknowledgments)

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 Christine Marie Ricks*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Christine Marie Ricks, Notary Public,*
State of California

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 7th day of March 2007*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 363160*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



John Bowen
Secretary of State



315
312

ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

California

County of San Mateo

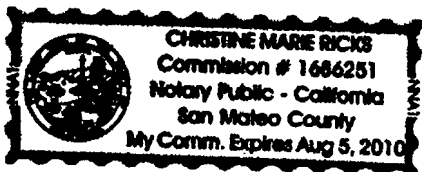
On March 5, 2007 before me, Christine Ricks, Notary Public
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Karen Billeci
Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ (or proved to me on the basis of satisfactory evidence)

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

WITNESS my hand and official seal.



Place Notary Seal Above

[Signature]
Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Assignment - Colombia

Document Date: March 5, 2007 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: Judy Young, Zhong Zheng, Timothy R. Schwartz

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: Karen Billeci

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

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

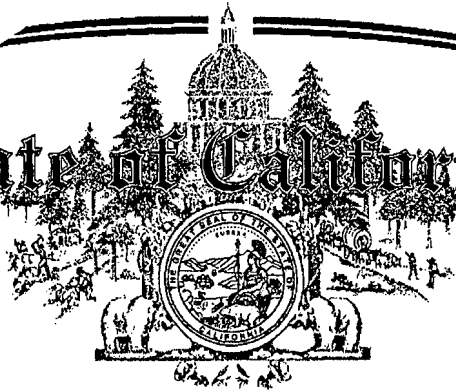
Signer's Name: _____

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

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

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 Christine Marie Ricks*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Christine Marie Ricks, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 7th day of March 2007*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 363161*
9. *Seal/Stamp:*



10. Signature

Jana Bowen
Secretary of State



318
318

JORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

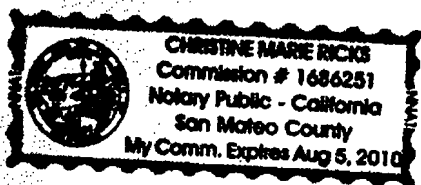
County of San Mateo

On March 5, 2007 before me, Christine Ricks, Notary Public
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Judy Young
Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ (or proved to me on the basis of satisfactory evidence)

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



WITNESS my hand and official seal.

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Assignment - Colombia

Document Date: March 5, 2007 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: Karen Billeci, Zhong Zheng, Timothy R. Schwartz

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: Judy Young

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

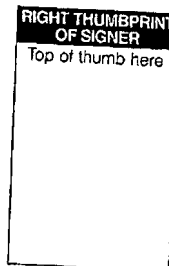
Signer Is Representing: _____



Signer's Name: _____

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

Signer Is Representing: _____



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 Christine Marie Ricks*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Christine Marie Ricks, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 7th day of March 2007*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 363162*
9. *Seal/Stamp:*



10. Signature

Jana Bowen
Secretary of State



319

PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

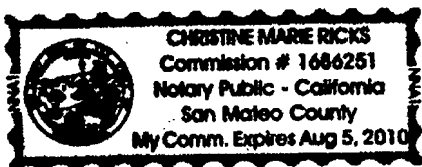
City of San Mateo
On March 5, 2007 before me, Christine Ricks, Notary Public
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Zhong Zheng
Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ (or proved to me on the basis of satisfactory evidence)

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

WITNESS my hand and official seal.



Place Notary Seal Above

Christine Ricks
Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Assignment - Colombia

Document Date: March 5, 2007 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: Karen Billeci, Judy Young, Timothy R Schwar

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: Zhong Zheng

☒ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s): _____

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

Signer's Name: _____

☐ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s): _____

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

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 Christine Marie Ricks
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of Christine Marie Ricks, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 7th day of March 2007
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 363163
9. Seal/Stamp:



10. Signature

Jana Bowen
Secretary of State



318
320

ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo
On March 5, 2007 before me, Christine Ricks, Notary Public
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me

☐ (or proved to me on the basis of satisfactory evidence)

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

WITNESS my hand and official seal.



Place Notary Seal Above

[Signature]
Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Assignment - Colombia

Document Date: March 5, 2007 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: Karen Billeci, Judy Young, Zhong Zheng

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: Timothy R. Schwartz
☐ Individual
☒ Corporate Officer -- Title(s): Associate General Counsel, Director
☐ Partner -- ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

Signer Is Representing: Genentech, Inc.

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

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

Signer Is Representing: _____

AS: 102976

(2/2)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by E. Bornett

3. acting in the capacity of Certifying Officer

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

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the thirteenth of March, 2007

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

8. No. 07016037-1

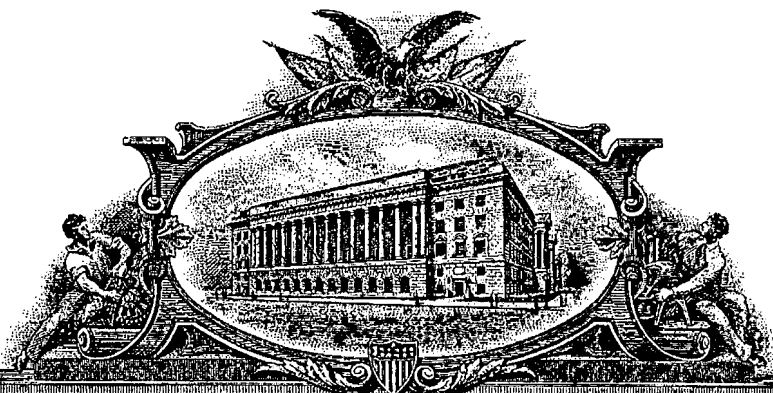
9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Patrick O. Hatchett
Patrick O. Hatchett

319
321

A 7051385



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

February 07, 2007

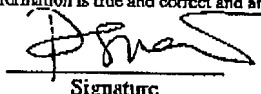
THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
NOVEMBER 19, 2004.

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

E. Bornett
E. BORNETT

Certifying Officer



RECORDATION FORM COVER SHEET PATENTS ONLY		U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE Patent and Trademark Office
Assistant Commissioner of Patents: Please record the attached original documents or copy thereof.		Atty Dkt No: PR2138
1. Name of conveying party(ies): Mark S. Dennis Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No	2. Name and address of receiving party(ies): Name: <u>GENENTECH, INC.</u> Internal Address: Street Address: <u>1 DNA Way</u> City: <u>South San Francisco</u> State: <u>California</u> ZIP: <u>94080-4990</u> Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No	
3. Nature of conveyance: ☒ Assignment Security Agreement Change of Name Other: Execution Date: <u>Nov. 9, 2004</u>		
4. Application number(s) or patent number(s): If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: A. Patent Application No.(s) <u>60/598,991</u> B. Patent No.(s) Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No		
5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed: Paul Naik, Ph.D. GENENTECH, INC. 1 DNA Way South San Francisco, CA 94080	6. Total number of applications and patents involved: <u>1</u> 7. Total fee (37 CFR 3.41): \$ <u>40.00</u> ☐ Enclosed ☒ Authorized to be charged to deposit account 8. Deposit account number: <u>07-0630</u>	
DO NOT USE THIS SPACE		
9. Statement and signature. To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document. <u>Paul Naik, Ph.D.</u> Name of Person Signing Registration No. 49,075  Signature <u>November 10, 2004</u> Date Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document: <u>3</u> Revised (10/11/95)		

CH \$40.00 070630 60598991

700132962

PATENT
REEL: 015395 FRAME: 0288

370
322

004 15:11 FROM: GENENTECH LEGAL 650 952 9881

TO: 917033065995

P: 3/3

Docket No. PR2138

ASSIGNMENT

WHEREAS, Mark S. Dennis, a citizen of United States of America, residing at 120 Plymouth, San Carlos, California 94070 (hereinafter "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

HUMANIZED ANTI-CMET ANTAGONISTS

for which a provisional application Serial No. 60/598,991, if received (Docket No. PR2138) has been filed by him on 05 August 2004; and

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

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

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

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

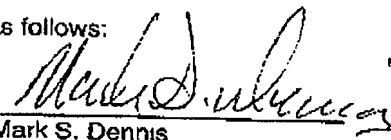
The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that he has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows:

South San Francisco

Dated: 11-9-04


Mark S. Dennis

RECORDED: 11/19/2004

PATENT
REEL: 015395 FRAME: 0289

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

ESTADO DE CALIFORNIA

[Sello]

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961)

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

CERTIFICADO

5. En Sacramento, California
6. el 7mo día de Marzo de 2007
7. por el Secretario de Estado Encargado, Estado de California
8. No. 363160
9. Sello/Timbre

Hay un sello que dice:

10. Firma

EL GRAN SELLO DE
EL ESTADO DE CALIFORNIA

(firma)
Secretario de Estado

321
323

ACUERDO PARA TODO TIPO DE PROPÓSITOS DE CALIFORNIA

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

El Marzo 5, 2007, ante mi Christine Ricks, Notario Público
Fecha Nombre y Título del Funcionario (ej. "Jane Doe, Notario Público")
se presentó Karen Billeci
Nombre(s) del Firmante(s)

Hay un sello que dice:

KIYOKO SHIMIZU
Comisión # 1527444
Notario Público - California
Condado de San Diego
Mi Comisión Vence Nov. 18, 2008

Colocar sello notarial arriba

☐ personalmente conocido por mi

☒ probado ante mi en base a evidencia satisfactoria que es la(s) persona(s) cuyo nombre(s) está(n) suscrito(s) al instrumento presente y reconoció ante mi que el/ella/ellos ejecutaron la misma en su/sus capacidad(es) autorizada(s), y que por su/sus firma(s) en el instrumento las personas o la entidad en nombre de la cual la persona actuó ejecutó el instrumento.

EN TESTIMONIO, mi firma y sello oficial.

(firma)

Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la información de abajo no es requerida por la ley, puede ser valiosa para personas que cuentan con el documento y podría evitar la remoción fraudulenta de este formato y su sujeción a otro documento

Descripción del Documento Anexo

Título o Tipo de Documento: Cesión - Colombia

Fecha del Documento: Marzo 5, 2007

Firmante(s) Además de los Nombrados Arriba: Judy Young, Zhong Zheng, Timothy R. Schwartz

Capacidad(es) Reclamada(s) por el Firmante(s)

Nombre del Firmante: Karen Billeci

☒ Individuo

☐ Funcionario Corporativo - Título(s): _____

☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General

☐ Abogado de Hecho

☐ Fiado

☐ Tutor Legal o Conservador

☐ Otro: _____

El Firmante Representa a:

HUELLA DACTILAR
DERECHA DEL
FIRMANTE

Capacidad(es) Reclamada(s) por el

Nombre del Firmante: _____

☐ Individuo

☐ Funcionario Corporativo - Título(s): _____

☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General

☐ Abogado de Hecho

☐ Fiado

☐ Tutor Legal o Conservador

☐ Otro: _____

El Firmante Representa a:

HUELLA DACTILAR
DERECHA DEL
FIRMANTE

ESTADO DE CALIFORNIA

[Sello]

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961)

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

CERTIFICADO

- 5. En Sacramento, California
- 6. el 7mo día de Marzo de 2007
- 7. por el Secretario de Estado Encargado, Estado de California
- 8. No. 363161
- 9. Sello/Timbre

Hay un sello que dice:

10. Firma

EL GRAN SELLO DE
EL ESTADO DE CALIFORNIA

(firma)
Secretario de Estado

322
324

ACUERDO PARA TODO TIPO DE PROPÓSITOS DE CALIFORNIA

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

El Marzo 5, 2007, ante mi Christine Ricks, Notario Público
Fecha Nombre y Título del Funcionario (ej. "Jane Doe, Notario Público")
se presentó Judy Young
Nombre(s) del Firmante(s)

Hay un sello que dice:

KIYOKO SHIMIZU
Comisión # 1527444
Notario Público – California
Condado de San Diego
Mi Comisión Vence Nov. 18, 2008

Colocar sello notarial arriba

- ☐ personalmente conocido por mi
- ☒ probado ante mí en base a evidencia satisfactoria que es la(s) persona(s) cuyo nombre(s) está(n) suscrito(s) al instrumento presente y reconoció ante mí que el/ella/ellos ejecutaron la misma en su/sus capacidad(es) autorizada(s), y que por su/sus firma(s) en el instrumento las personas o la entidad en nombre de la cual la persona actuó ejecutó el instrumento.

EN TESTIMONIO, mi firma y sello oficial.

(firma)
Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la información de abajo no es requerida por la ley, puede ser valiosa para personas que cuentan con el documento y podría evitar la remoción fraudulenta de este formato y su sujeción a otro documento

Descripción del Documento Anexo

Título o Tipo de Documento: Cesión – Colombia

Fecha del Documento: Marzo 5, 2007

Firmante(s) Además de los Nombrados Arriba: Judy Young, Zhong Zheng, Timothy R. Schwartz

Capacidad(es) Reclamada(s) por el Firmante(s)

Nombre del Firmante: Judy Young

- ☒ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____

- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de Hecho
☐ Fiado
☐ Tutor Legal o Conservador
☐ Otro: _____

El Firmante Representa a:

HUELLA DACTILAR
DERECHA DEL
FIRMANTE

Capacidad(es) Reclamada(s) por el

Nombre del Firmante: _____

- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____

- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de Hecho
☐ Fiado
☐ Tutor Legal o Conservador
☐ Otro: _____

El Firmante Representa a:

HUELLA DACTILAR
DERECHA DEL
FIRMANTE

ESTADO DE CALIFORNIA

[Sello]

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961)

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

CERTIFICADO

- 5. En Sacramento, California
- 6. el 7mo día de Marzo de 2007
- 7. por el Secretario de Estado Encargado, Estado de California
- 8. No. 363162
- 9. Sello/Timbre

Hay un sello que dice:

10. Firma

EL GRAN SELLO DE
EL ESTADO DE CALIFORNIA

(firma)
Secretario de Estado

323
325

ACUERDO PARA TODO TIPO DE PROPÓSITOS DE CALIFORNIA

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

El Marzo 5, 2007, ante mi Christine Ricks, Notario Público
Fecha Nombre y Título del Funcionario (e). "Jane Doe, Notario Público")
se presentó Zhong Zheng
Nombre(s) del Firmante(s)

Hay un sello que dice:

KIYOKO SHIMIZU
Comisión # 1527444
Notario Público – California
Condado de San Diego
Mi Comisión Vence Nov. 18, 2008

Colocar sello notarial arriba

- ☐ personalmente conocido por mí
- ☒ probado ante mí en base a evidencia satisfactoria que es la(s) persona(s) cuyo nombre(s) está(n) suscrito(s) al instrumento presente y reconoció ante mí que el/ella/ellos ejecutaron la misma en su/sus capacidad(es) autorizada(s), y que por su/sus firma(s) en el instrumento las personas o la entidad en nombre de la cual la persona actuó ejecutó el instrumento.

EN TESTIMONIO, mi firma y sello oficial.

(firma)
Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la información de abajo no es requerida por la ley, puede ser valiosa para personas que cuentan con el documento y podría evitar la remoción fraudulenta de este formato y su sujeción a otro documento

Descripción del Documento Anexo

Título o Tipo de Documento: Cesión – Colombia

Fecha del Documento: Marzo 5, 2007

Firmante(s) Además de los Nombrados Arriba: Judy Young, Zhong Zheng, Timothy R. Schwartz

Capacidad(es) Reclamada(s) por el Firmante(s)

- Nombre del Firmante: Zhong Zheng
- ☒ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de Hecho
☐ Fiado
☐ Tutor Legal o Conservador
☐ Otro: _____

El Firmante Representa a:

HUELLA DACTILAR
DERECHA DEL
FIRMANTE

Capacidad(es) Reclamada(s) por el

- Nombre del Firmante: _____
- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de Hecho
☐ Fiado
☐ Tutor Legal o Conservador
☐ Otro: _____

El Firmante Representa a:

HUELLA DACTILAR
DERECHA DEL
FIRMANTE

ESTADO DE CALIFORNIA

[Sello]

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961)

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

CERTIFICADO

- 5. En Sacramento, California
- 6. el 7mo día de Marzo de 2007
- 7. por el Secretario de Estado Encargado, Estado de California
- 8. No. 363163
- 9. Sello/Timbre

Hay un sello que dice:

10. Firma

EL GRAN SELLO DE
EL ESTADO DE CALIFORNIA

(firma)
Secretario de Estado

326

ACUERDO PARA TODO TIPO DE PROPÓSITOS DE CALIFORNIA

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

El Marzo 5, 2007, ante mi Christine Ricks, Notario Público
Fecha Nombre y Título del Funcionario (ej. "Jane Doe, Notario Público")
se presentó Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Nombre(s) del Firmante(s)

Hay un sello que dice:

KIYOKO SHIMIZU
Comisión # 1527444
Notario Público – California
Condado de San Diego
Mi Comisión Vence Nov. 18, 2008

Colocar sello notarial arriba

- ☐ personalmente conocido por mi
- ☒ probado ante mi en base a evidencia satisfactoria que es la(s) persona(s) cuyo nombre(s) está(n) suscrito(s) al instrumento presente y reconoció ante mi que el/ella/ellos ejecutaron la misma en su/sus capacidad(es) autorizada(s), y que por su/sus firma(s) en el instrumento las personas o la entidad en nombre de la cual la persona actuó ejecutó el instrumento.

EN TESTIMONIO, mi firma y sello oficial.

(firma)
Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la información de abajo no es requerida por la ley, puede ser valiosa para personas que cuentan con el documento y podría evitar la remoción fraudulenta de este formato y su sujeción a otro documento

Descripción del Documento Anexo

Título o Tipo de Documento: Cesión – Colombia

Fecha del Documento: Marzo 5, 2007

Firmante(s) Además de los Nombrados Arriba: Judy Young, Zhong Zheng, Timothy R. Schwartz

Capacidad(es) Reclamada(s) por el Firmante(s)

Nombre del Firmante: Timothy R. Schwartz, Director

- ☒ Individuo Consejero General Asociado
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____

- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de Hecho
☐ Fiado
☐ Tutor Legal o Conservador
☐ Otro: _____

El Firmante Representa a:
Genentech, Inc.

HUELLA DACTILAR
DERECHA DEL
FIRMANTE

Capacidad(es) Reclamada(s) por el

Nombre del Firmante: _____

- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____

- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de Hecho
☐ Fiado
☐ Tutor Legal o Conservador
☐ Otro: _____

El Firmante Representa a:

HUELLA DACTILAR
DERECHA DEL
FIRMANTE

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

APOSTILLA

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

1. Pais: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por E. Bornett

3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica

4. lleva el sello/timbre de la Oficina de marcas y patentes

Certificado

5. en Washington D.C.

6. el trece de Marzo de 2007

7. por el Funcionario de autenticación, Departamento de Estado de Estados Unidos

8. No. 07016037-1

9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Patrick O. Hatchett

[sello]

~~325~~
327

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGARLE LA PRESENTE:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos

Febrero 07 de 2007

ESTE ES PARA CERTIFICAR QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA
DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO ARCHIVADO EL
19 DE NOVIEMBRE DE 2004.

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

E. BORNETT
Funcionario que Certifica

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

HOJA DE PORTADA DEL FORMULARIO DE REGISTRO SOLAMENTE PATENTES		Departamento de Comercio Oficina de Marcas y Patentes Expediente de abogado No. PR2138
Comisionado Asistente para patentes: Por favor archive los documentos originales anexos o copias de los mismos		
1. Nombre de la(s) parte(s) cedente(s): Mark S. Dennis (Se anexa(n) nombre(s) adicional(es) de parte(s) cedente(s)? _ Si ☒ No	2. Nombre y dirección de la(s) parte(s) receptora(s) Nombre: <u>GENENTECH, INC.</u> Dirección interna: Dirección: <u>1 DNA Way</u> Ciudad: <u>South San Francisco</u> Estado: <u>California</u> ZIP: <u>94080-4990</u> ¿Se anexan Nombre(s) y dirección(es) adicional(es)? _ Si ☒ No	
3. Naturaleza del traspaso: ☒ Cesión Fusión Acuerdo de Seguridad Cambio de Nombre Otro: Fecha de Ejecución: <u>Noviembre 9, 2004</u>		
4. Numero(s) de solicitud o número(s) de patente: Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: A. Solicitud de patente No(s). B. Patente No(s). 60/598,991 ¿Se anexa números adicionales? _ Si ☒ No		
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar la correspondencia: Paul Naik, Ph.D. GENENTECH, INC. 1DNA Way South San Francisco, CA 94080		6. Numero total de solicitudes y patentes involucradas: <u>1</u> 7. Tarifa total (37 C.F.R 3.41): <u>\$40.00</u> ☐ Adjunta ☒ Autorizado para cargarla a cuenta de depósito 8. Número de cuenta de Depósito: <u>07-0630</u>
NO USE ESTE ESPACIO		
9. Declaración y firma. hasta donde se y creo, la información anterior es verdadera y correcta y cualquier copia anexa es una copia verdadera del documento original. Paul Naik Ph.D. Nombre de la persona que firma Registro No. 40378 (Firma) Firma Noviembre 10, 2004 Fecha Número total de páginas que comprenden portada, anexos y documento: 3		

700132962

PATENTE
ROLLO: 015395 CUADRO 0288

326
328

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, Mark S. Dennis, un ciudadano de los Estados Unidos de América, residente en 120 Plymouth, San Carlos, CA 94070 (en adelante referidos como "CEDENTE"), ha inventado una invención nueva y útil

ANTAGONISTAS HUMANIZADOS ANTI-CMET

para la cual se presentó la solicitud provisional No. 60/598,991 (Expediente No. PR2138) por ellos el 5 de Agosto de 2004; y

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

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

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

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

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

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

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

(Firma)
Mark S. Dennis

Fechado: 11/09/04

CERTIFICADO: 11/19/2004

PATENTE
ROLLO: 015395 CUADRO 09289