

07-12528



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PCT
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

07-12528

54. TITULO ANTAGONISTAS HUMANIZADOS ANTI-CMET

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

FM 05-03-2007
Cesón

SS

PETITORIO

AS: 102.976



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-012528- -00000-0000
Fee: 2007-02-08 16:15:03 Dep. 2020 NUECREACIONES
Trib. 11 PATENTE/II
Eve: 378 FASENACIONALJ
Act 411 PRESENTACION Folios: 508

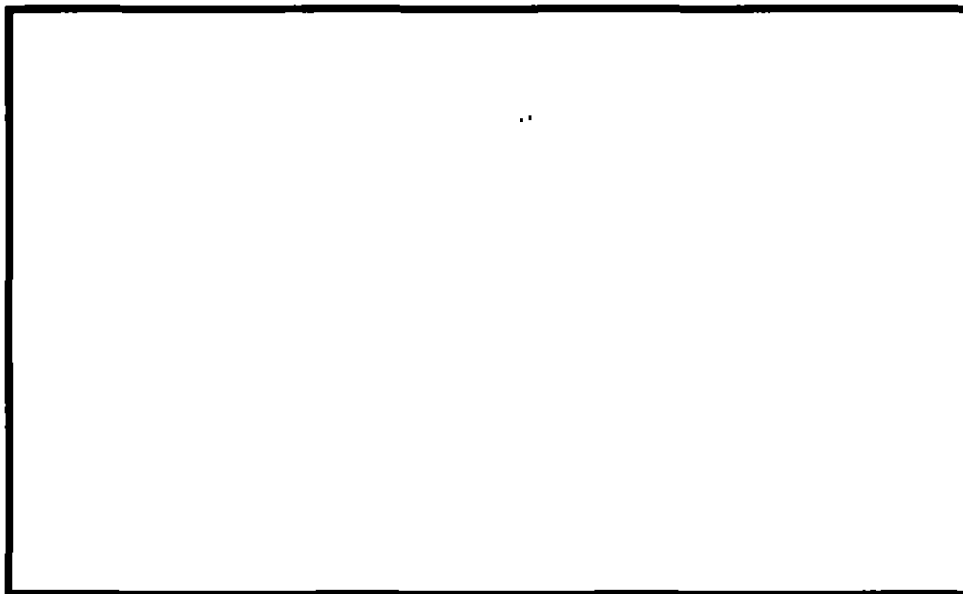
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: GENENTECH, INC. Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos Lugar de Constitución: Estados Unidos Teléfono: Fax: E-mail:		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Carrera 7 # 71 – 21 Torre B – Piso 4 Teléfono: 744-2200 Fax: 744-2700 E-mail:		IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>80.410.337 TP 57492</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Mark S. Dennis, Karen Billeci, Judy Young, Zhong Zheng. Dirección: 120 Plymouth, San Carlos, California 94070, US; 5247 Shelter Creek Lane, San Bruno, California 94086, US; 2833 Tramento Drive, San Carlos, CA, California 94070, US; 1175 Balclutha Drive, Foster City, California 94404, US (Respectivamente) Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2005/027626</u> Fecha <u>04-08-2005</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2006/015371 A3</u> Fecha <u>09-02-2006</u>			
6 Título (54): <u>ANTAGONISTAS HUMANIZADOS ANTI-CMET</u>			
7 Clasificación Internacional (51) _____			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>05-08-2004</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/598.991</u>
9 Comprobante de pago No. <u>06-92.549 y 07-1.462</u> Fecha <u>06-02-2007</u>			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.			

2020-F06 (01-11-15)

N

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$482.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia Autenticada**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Tarjeta de Propietarios
Listado de Secuencias
Documentos PCT

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:**12 Solicito la concesión de la patente,**NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE ☒ PCT/US2005/027625 MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

SOLICITANTE/S. RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

TITULO ANTAGONISTAS HUMANIZADOS ANTI-CMET

EXPEDIENTE No. _____ CLASIFICACION _____

CERTIFICADO No. _____ FECHA DE SOLICITUD _____ ROLLO MICROFILM _____

PRORROGA _____ FECHA DE CONCESION _____ VIGENCIA DESDE _____ HASTA _____

TRASPASO A _____ CAMBIO DE NOMBRE _____

INVENTOR (ES) MARK S. DENNIS, KAREN BILLECI, JUDY YOUNG, ZHONG ZHENG

OTROS _____

OFICINA DE COMUNICACIONES

As 102.976

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 92,549
FECHA : DICIEMBRE 4 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-012528- -00000-0000
Fee: 2007-02-08 18:15:03 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYI
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 508

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRISARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	55049505	01/12/2006	28,470,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.

SOM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

5

11/1

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 1,462
FECHA : ENERO 5 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-012528- -00000-0000
Fee: 2007-02-08 18:15:03 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 508

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	52420085	04/01/2007	2,487,640.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA ABC ANTR
			TOTAL : \$ 19,000.00

SON: DIEZ Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 February 2006 (09.02.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/015371 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2005/027626

(22) International Filing Date: 4 August 2005 (04.08.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date:
60/598,991 5 August 2004 (05.08.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DENNIS, Mark S. [US/US]; 120 Plymouth, San Carlos, California 94070 (US). BILLECI, Karen [US/US]; 5247 Shelter Creek Lane, San Bruno, California 94066 (US). YOUNG, Judy [US/US]; 2833 Tramonto Drive, San Carlos, CA, California 94070 (US). ZHENG, Zhong [US/US]; 1175 Balciutha Drive, Foster City, California 94404 (US).

(74) Agent: NAIK, Paul; Genentech, Inc., MS 49, 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

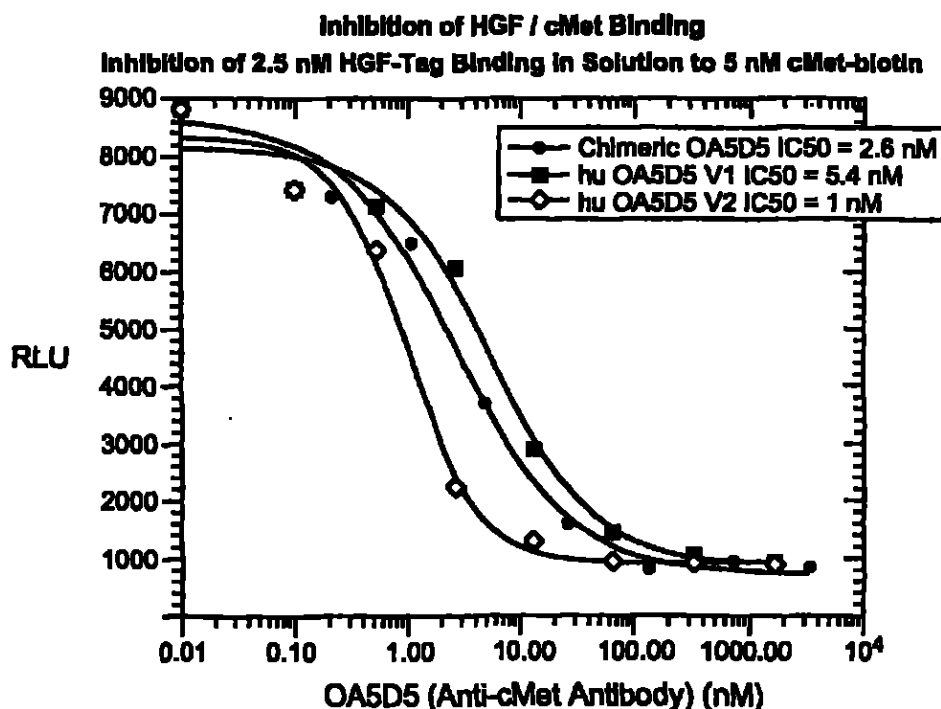
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IR, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

[Continued on next page]

(54) Title: HUMANIZED ANTI-CMET ANTAGONISTS



(57) Abstract: Therapeutic anti-c-met antibodies, and compositions comprising and methods of using these antibodies.

6 2

WO 2006/015371 A3



(88) Date of publication of the international search report:
3 August 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(15) Information about Correction:

Previous Correction:

see PCT Gazette No. 13/2006 of 30 March 2006



PCT

(43) International Publication Date
9 February 2006 (09.02.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/015371 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/00 (2006.01)

California 94070 (US). ZHENG, Zhong [US/US]; 1175
Balclutha Drive, Foster City, California 94404 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2005/027626

(74) Agent: NAIK, Paul; Genentech, Inc., MS 49, 1 DNA Way,
South San Francisco, California 94080 (US).

(22) International Filing Date: 4 August 2005 (04.08.2005)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/598,991 5 August 2004 (05.08.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-
TECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,
California 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,

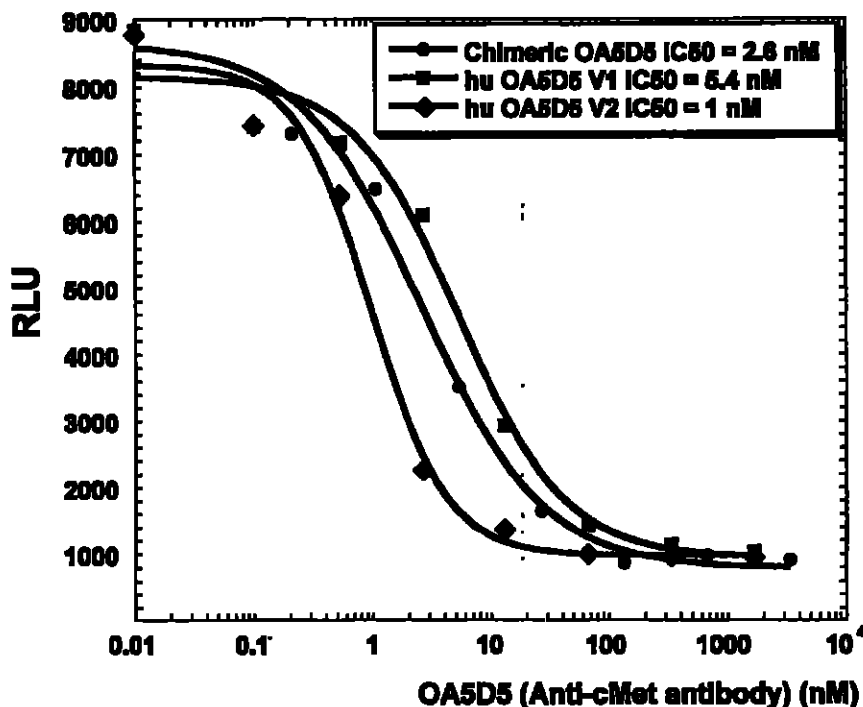
(75) Inventors/Applicants (for US only): DENNIS, Mark
S. [US/US]; 120 Plymouth, San Carlos, California 94070
(US). BILLECI, Karen [US/US]; 5247 Shelter Creek
Lane, San Bruno, California 94066 (US). YOUNG,
Judy [US/US]; 2833 Tramanto Drive, San Carlos, CA,

[Continued on next page]

(54) Title: HUMANIZED ANTI-CMET ANTAGONISTS

Inhibition of HGF/ cMet Binding

Inhibition of 2.5 nM HGF-Tag binding
in solution to 5 nM cMet-biotin



(57) Abstract: The invention
provides therapeutic anti-c-met
antibodies, and compositions
comprising and methods of using
these antibodies.

6 9

WO 2006/015371 A2



RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

5

HUMANIZED ANTI-CMET ANTAGONISTS

RELATED APPLICATIONS

10

This application is a non-provisional application filed under 37 CFR 1.53(b)(1), claiming priority under 35 USC 119(e) to provisional application number 60/598,991 filed August 5, 2004, the contents of which are incorporated herein in their entirety by reference.

15

TECHNICAL FIELD

The present invention relates generally to the fields of molecular biology and growth factor regulation. More specifically, the invention concerns modulators of the HGF/c-met signaling pathway, and uses of said modulators.

BACKGROUND

20

HGF is a mesenchyme-derived pleiotrophic factor with mitogenic, motogenic and morphogenic activities on a number of different cell types. HGF effects are mediated through a specific tyrosine kinase, c-met, and aberrant HGF and c-met expression are frequently observed in a variety of tumors. See, e.g., Maulik et al., Cytokine & Growth Factor Reviews (2002), 13:41-59; Danilkovitch-Miagkova & Zbar, J. Clin. Invest. (2002), 109(7):863-867. Regulation of the HGF/c-Met signaling pathway is implicated in tumor progression and metastasis. See, e.g., Trusolino & Comoglio, Nature Rev. (2002), 2:289-300).

25

30

35

HGF binds the extracellular domain of the Met receptor tyrosine kinase (RTK) and regulates diverse biological processes such as cell scattering, proliferation, and survival. HGF-Met signaling is essential for normal embryonic development especially in migration of muscle progenitor cells and development of the liver and nervous system (Bladt et al., 1995; Hamanoue et al., 1996; Maina et al., 1996; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995). Developmental phenotypes of Met and HGF knockout mice are very similar suggesting that HGF is the cognate ligand for the Met receptor (Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995). HGF-Met also plays a role in liver regeneration, angiogenesis, and wound healing (Bussolino et al., 1992; Matsumoto and Nakamura, 1993; Nusrat et al., 1994). The precursor Met receptor undergoes proteolytic cleavage into an extracellular α subunit and membrane spanning β subunit linked by disulfide bonds (Tempest et al., 1988). The β subunit contains the cytoplasmic kinase domain and harbors a multi-substrate docking site at the C-terminus where adapter proteins bind and initiate signaling (Bardelli et al., 1997; Nguyen et al., 1997; Pelicci et al., 1995; Ponzetto et al., 1994; Weidner et al., 1996). Upon HGF binding, activation of Met leads to

tyrosine phosphorylation and downstream signaling through Gab1 and Grb2/Sos mediated PI3-kinase and Ras/MAPK activation respectively, which drives cell motility and proliferation (Furge et al., 2000; Hartmann et al., 1994; Ponzetto et al., 1996; Royal and Park, 1995).

Met was shown to be transforming in a carcinogen-treated osteosarcoma cell line (Cooper et al., 1984; Park et al., 1986). Met overexpression or gene-amplification has been observed in a variety of human cancers. For example, Met protein is overexpressed at least 5-fold in colorectal cancers and reported to be gene-amplified in liver metastasis (Di Renzo et al., 1995; Liu et al., 1992). Met protein is also reported to be overexpressed in oral squamous cell carcinoma, hepatocellular carcinoma, renal cell carcinoma, breast carcinoma, and lung carcinoma (Jin et al., 1997; Morello et al., 2001; Natali et al., 1996; Olivero et al., 1996; Suzuki et al., 1994). In addition, overexpression of mRNA has been observed in hepatocellular carcinoma, gastric carcinoma, and colorectal carcinoma (Boix et al., 1994; Kuniyasu et al., 1993; Liu et al., 1992).

A number of mutations in the kinase domain of Met have been found in renal papillary carcinoma which leads to constitutive receptor activation (Olivero et al., 1999; Schmidt et al., 1997; Schmidt et al., 1999). These activating mutations confer constitutive Met tyrosine phosphorylation and result in MAPK activation, focus formation, and tumorigenesis (Jeffers et al., 1997). In addition, these mutations enhance cell motility and invasion (Giordano et al., 2000; Lorenzato et al., 2002). HGF-dependent Met activation in transformed cells mediates increased motility, scattering, and migration which eventually leads to invasive tumor growth and metastasis (Jeffers et al., 1996; Meinert et al., 1998).

Met has been shown to interact with other proteins that drive receptor activation, transformation, and invasion. In neoplastic cells, Met is reported to interact with $\alpha 6 \beta 4$ integrin, a receptor for extracellular matrix (ECM) components such as laminins, to promote HGF-dependent invasive growth (Trusolino et al., 2001). In addition, the extracellular domain of Met has been shown to interact with a member of the semaphorin family, plexin B1, and to enhance invasive growth (Giordano et al., 2002). Furthermore, CD44v6, which has been implicated in tumorigenesis and metastasis, is also reported to form a complex with Met and HGF and result in Met receptor activation (Orian-Rousseau et al., 2002).

Met is a member of the subfamily of RTKs which include Ron and Sea (Maulik et al., 2002). Prediction of the extracellular domain structure of Met suggests shared homology with the semaphorins and plexins. The N-terminus of Met contains a Sema domain of approximately 500 amino acids that is conserved in all semaphorins and plexins. The semaphorins and plexins belong to a large family of secreted and membrane-bound proteins first described for their role in neural development (Van Vactor and Lorenz, 1999). However, more recently semaphorin overexpression has been correlated with tumor invasion and metastasis. A cysteine-rich PSI domain (also referred to as a Met Related Sequence domain) found in plexins, semaphorins, and integrins lies adjacent to the Sema domain followed by four IPT repeats that are immunoglobulin-like regions found in plexins and

transcription factors. A recent study suggests that the Met Sema domain is sufficient for HGF and heparin binding (Gherardi et al., 2003). Furthermore, Kong-Beltran et al. (Cancer Cell (2004), 6:61-73) have reported that the Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation.

Numerous molecules targeted at the HGF/c-met pathway have been reported. These
5 molecules include antibodies such as those described in U. S. Pat. No. 5,686,292. A portion of the extracellular domain of c-met has also been shown to be capable of antagonistic effects against the HGF/c-met pathway. In view of the important role that this pathway plays in the etiology of various pathological conditions, however, it is clear that there continues to be a need for agents that have clinical attributes that are optimal for development as therapeutic agents. The invention described
10 herein meets this need and provides other benefits.

All references cited herein, including patent applications and publications, are incorporated by reference in their entirety.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

15 The invention is in part based on the identification of a variety of antagonists of the HGF/c-met biological pathway, which is a biological/cellular process that presents as an important and advantageous therapeutic target. The invention provides compositions and methods based on interfering with HGF/c-met activation, including but not limited to interfering with HGF binding to the extracellular portion of c-met and receptor multimerization. Antagonists of the invention, as
20 described herein, provide important therapeutic and diagnostic agents for use in targeting pathological conditions associated with abnormal or unwanted signaling of the HGF/c-met pathway. Accordingly, the invention provides methods, compositions, kits and articles of manufacture related to modulating the HGF/c-met pathway, including modulation of c-met ligand binding, c-met dimerization, activation, and other biological/physiological activities associated with HGF/c-met signaling.

25 In one aspect, the invention provides anti-HGF/c-met therapeutic agents suitable for therapeutic use and capable of effecting varying degrees of disruption of the HGF/c-met signaling pathway. For example, in one embodiment, the invention provides a humanized anti-c-met antibody wherein the monovalent affinity of the antibody to human c-met (e.g., affinity of the antibody as a Fab fragment to human c-met) is substantially the same as the monovalent affinity of a murine antibody
30 (e.g., affinity of the murine antibody as a Fab fragment to human c-met) comprising, consisting or consisting essentially of a light chain and heavy chain variable domain sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO:9 and 10). In another embodiment, the invention provides a humanized anti-c-met antibody wherein the monovalent affinity of the antibody to human c-met (e.g., affinity of the antibody as a Fab fragment to human c-met) is lower, for example at least 3, 5, 7 or 10-fold lower,
35 than the monovalent affinity of a murine antibody (e.g., affinity of the murine antibody as a Fab fragment to human c-met) comprising, consisting or consisting essentially of a light chain and heavy chain variable domain sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10). In another

embodiment, the invention provides an anti-c-met humanized antibody wherein the monovalent affinity of the antibody to human c-met (e.g., affinity of the antibody as a Fab fragment to human c-met) is greater, for example at least 3, 5, 7, 10 or 13-fold greater, than the monovalent affinity of a murine antibody (e.g., affinity of the murine antibody as a Fab fragment to human c-met) comprising, consisting or consisting essentially of a light chain and heavy chain variable domain sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10). In one embodiment, the monovalent affinity of the murine antibody to human c-met is substantially the same as the binding affinity of a Fab fragment comprising variable domain sequences of an antibody produced by hybridoma cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number ATCC HB-11894 (hybridoma 1A3.3.13) or HB-11895 (hybridoma 5D5.11.6). As is well-established in the art, binding affinity of a ligand to its receptor can be determined using any of a variety of assays, and expressed in terms of a variety of quantitative values. Accordingly, in one embodiment, the binding affinity is expressed as Kd values and reflects intrinsic binding affinity (e.g., with minimized avidity effects). Generally and preferably, binding affinity is measured *in vitro*, whether in a cell-free or cell-associated setting. As described in greater detail herein, fold difference in binding affinity can be quantified in terms of the ratio of the monovalent binding affinity value of a humanized antibody (e.g., in Fab form) and the monovalent binding affinity value of a reference/comparator antibody (e.g., in Fab form) (e.g., a murine antibody having donor hypervariable region sequences), wherein the binding affinity values are determined under similar assay conditions. Thus, in one embodiment, the fold difference in binding affinity is determined as the ratio of the Kd values of the humanized antibody in Fab form and said reference/comparator Fab antibody. For example, in one embodiment, if an antibody of the invention (A) has an affinity that is "3-fold lower" than the affinity of a reference antibody (M), then if the Kd value for A is 3x, the Kd value of M would be 1x, and the ratio of Kd of A to Kd of M would be 3:1. Conversely, in one embodiment, if an antibody of the invention (C) has an affinity that is "3-fold greater" than the affinity of a reference antibody (R), then if the Kd value for C is 1x, the Kd value of R would be 3x, and the ratio of Kd of C to Kd of R would be 1:3. Any of a number of assays known in the art, including those described herein, can be used to obtain binding affinity measurements, including, for example, Biacore, radioimmunoassay (RIA) and ELISA.

In one aspect, a HGF/c-met antagonist of the invention comprises an anti-c-met antibody comprising:

(a) at least one, two, three, four or five hypervariable region (HVR) sequences selected from the group consisting of:

(i) HVR-L1 comprising sequence A1-A17, wherein A1-A17 is KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO:1)

(ii) HVR-L2 comprising sequence B1-B7, wherein B1-B7 is WASTRES (SEQ ID NO:2)

(iii) HVR-L3 comprising sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQYYAYPWT (SEQ ID NO:3)

(iv) HVR-H1 comprising sequence D1-D10, wherein D1-D10 is GYTFTSYV^{LH} (SEQ ID NO:4)

(v) HVR-H2 comprising sequence E1-E18, wherein E1-E18 is GMIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO:5) and

5 (vi) HVR-H3 comprising sequence F1-F11, wherein F1-F11 is XYGSYVSPLDY (SEQ ID NO:6) and X is not R;

and (b) at least one variant HVR, wherein the variant HVR sequence comprises modification of at least one residue of the sequence depicted in SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5 or 6. In one embodiment, HVR-L1 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO:1. In one
10 embodiment, HVR-L2 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO:2. In one embodiment, HVR-L3 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO:3. In one embodiment, HVR-H1 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO:4. In one embodiment, HVR-H2 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO:5. In one embodiment, HVR-H3 of an antibody of the invention comprises the sequence of
15 SEQ ID NO:6. In one embodiment, HVR-H3 comprises TYGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 7). In one embodiment, HVR-H3 comprises SYGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 8). In one embodiment, an antibody of the invention comprising these sequences (in combination as described herein) is humanized or human.

In one aspect, the invention provides an antibody comprising one, two, three, four, five or six
20 HVRA, wherein each HVR comprises, consists or consists essentially of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8, and wherein SEQ ID NO:1 corresponds to an HVR-L1, SEQ ID NO:2 corresponds to an HVR-L2, SEQ ID NO:3 corresponds to an HVR-L3, SEQ ID NO:4 corresponds to an HVR-H1, SEQ ID NO:5 corresponds to an HVR-H2, and SEQ ID NOs:6, 7 or 8 corresponds to an HVR-H3. In one embodiment, an antibody of the invention
25 comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 and 7. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 and 8.

Variant HVRs in an antibody of the invention can have modifications of one or more residues
30 within the HVR. In one embodiment, a HVR-L2 variant comprises 1-5 (1, 2, 3, 4 or 5) substitutions in any combination of the following positions: B1 (M or L), B2 (P, T, G or S), B3 (N, G, R or T), B4 (I, N or F), B5 (P, I, L or G), B6 (A, D, T or V) and B7 (R, I, M or G). In one embodiment, a HVR-H1 variant comprises 1-5 (1, 2, 3, 4 or 5) substitutions in any combination of the following positions: D3 (N, P, L, S, A, I), D5 (I, S or Y), D6 (G, D, T, K, R), D7 (F, H, R, S, T or V) and D9 (M or V). In one embodiment, a HVR-H2 variant comprises 1-4 (1, 2, 3 or 4) substitutions in any
35 combination of the following positions: E7 (Y), E9 (I), E10 (I), E14 (T or Q), E15 (D, K, S, T or V), E16 (L), E17 (E, H, N or D) and E18 (Y, E or H). In one embodiment, a HVR-H3 variant comprises

15 1-5 (1, 2, 3, 4 or 5) substitutions in any combination of the following positions: 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) and F11 (Q, S, H, F). Letter(s) in parenthesis following each position indicates an illustrative substitution (i.e., replacement) amino acid; as would be evident to one skilled in the art, suitability of other amino acids as substitution amino acids in the context described herein can be routinely assessed using techniques known in the art and/or described herein. In one embodiment, a HVR-L1 comprises the sequence of SEQ ID NO:1. In one embodiment, F1 in a variant HVR-H3 is T. In one embodiment, F1 in a variant HVR-H3 is S. In one embodiment, F3 in a variant HVR-H3 is R. In one embodiment, F3 in a variant HVR-H3 is S. In one embodiment, F7 in a variant HVR-H3 is T. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H3 wherein F1 is T or S, F3 is R or S, and F7 is T.

15 In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H3 wherein F1 is T, F3 is R and F7 is T. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H3 wherein F1 is S. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H3 wherein F1 is T, and F3 is R. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H3 wherein F1 is S, F3 is R and F7 is T. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H3 wherein F1 is T, F3 is S, F7 is T, and F8 is S. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H3 wherein F1 is T, F3 is S, F7 is T, and F8 is A. In some embodiments, said variant HVR-H3 antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 and HVR-H2 wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4 and 5. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ I light chain framework consensus sequence.

25 In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L2 wherein B6 is V. In some embodiments, said variant HVR-L2 antibody further comprises HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5 and 6. In some embodiments, said variant HVR-L2 antibody further comprises HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5 and 7. In some embodiments, said variant HVR-L2 antibody further comprises HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5 and 8. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ I light chain

framework consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E14 is T, E15 is K and E17 is E. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E17 is E. In some embodiments, said variant HVR-H3 antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, and HVR-H3 wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4 and 6. In some embodiments, said variant HVR-H2 antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, and 7. In some embodiments, said variant HVR-H2 antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, and 8. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ light chain framework consensus sequence.

In one aspect, the invention provides an antibody comprising one, two, three, four, five or all of the HVR sequences depicted in Fig. 2, 3 and/or 4 (SEQ ID NOs:56-163).

A therapeutic agent for use in a host subject preferably elicits little to no immunogenic response against the agent in said subject. In one embodiment, the invention provides such an agent. For example, in one embodiment, the invention provides a humanized antibody that elicits and/or is expected to elicit a human anti-mouse antibody response (HAMA) at a substantially reduced level compared to an antibody comprising the sequence of SEQ ID NO: 9 & 10 in a host subject. In another example, the invention provides a humanized antibody that elicits and/or is expected to elicit minimal or no human anti-mouse antibody response (HAMA). In one example, an antibody of the invention elicits anti-mouse antibody response that is at or less than a clinically-acceptable level.

A humanized antibody of the invention may comprise one or more human and/or human consensus non-hypervariable region (e.g., framework) sequences in its heavy and/or light chain variable domain. In some embodiments, one or more additional modifications are present within the human and/or human consensus non-hypervariable region sequences. In one embodiment, the heavy chain variable domain of an antibody of the invention comprises a human consensus framework sequence, which in one embodiment is the subgroup III consensus framework sequence. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant subgroup III consensus framework sequence modified at at least one amino acid position. For example, in one embodiment, a variant subgroup III consensus framework sequence may comprise a substitution at one or more of positions 71, 73 and/or 78. In one embodiment, said substitution is R71A, N73T and/or N78A, in any combination thereof.

As is known in the art, and as described in greater detail hereinbelow, the amino acid

position/boundary delineating a hypervariable region of an antibody can vary, depending on the context and the various definitions known in the art (as described below). Some positions within a variable domain may be viewed as hybrid hypervariable positions in that these positions can be deemed to be within a hypervariable region under one set of criteria while being deemed to be outside a hypervariable region under a different set of criteria. One or more of these positions can also be found in extended hypervariable regions (as further defined below). The invention provides antibodies comprising modifications in these hybrid hypervariable positions. In one embodiment, these hybrid hypervariable positions include one or more of positions 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94 and 102 in a heavy chain variable domain. In one embodiment, these hybrid hypervariable positions include one or more of positions 24-29, 35-36, 46-49, 56 and 97 in a light chain variable domain. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant human subgroup consensus framework sequence modified at one or more hybrid hypervariable positions. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising a variant human subgroup III consensus framework sequence modified at one or more of positions 27-28, 30, 33-35, 49, 57-65, 94 and 102. In one embodiment, the antibody comprises a F27Y substitution. In one embodiment, the antibody comprises a T28N, P, L, S, A or I substitution. In one embodiment, the antibody comprises a S30I, T or Y substitution. In one embodiment, the antibody comprises a A33W substitution. In one embodiment, the antibody comprises a M34L or M34V substitution. In one embodiment, the antibody comprises a S35H substitution. In one embodiment, the antibody comprises a T57I substitution. In one embodiment, the antibody comprises a Y58R substitution. In one embodiment, the antibody comprises a Y59F substitution. In one embodiment, the antibody comprises a A60N substitution. In one embodiment, the antibody comprises a D61P, T or Q substitution. In one embodiment, the antibody comprises a S62N, D, K, T or V substitution. In one embodiment, the antibody comprises a V63F or V63L substitution. In one embodiment, the antibody comprises a K64E, H, N, D or Q substitution. In one embodiment, the antibody comprises a G65D, Y, E or H substitution. In one embodiment, the antibody comprises a R94T or R94S substitution. In one embodiment, the antibody comprises a Y102Q, S, H or F substitution. In one embodiment, an antibody of the invention comprising said R94T or R94S modification further comprises one or more modifications at position 96 and/or 100. In one embodiment, said modifications comprise a G96R and/or S100T substitution (i.e., in HVR-H3). In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain comprising a variant human kappa subgroup I consensus framework sequence modified at one or more of positions 24, 25, 29 and 56. In one embodiment, the antibody comprises a R24K substitution. In one embodiment, the antibody comprises a A25S substitution. In one embodiment, the antibody comprises a I29Q substitution. In one embodiment, the antibody comprises a S56R, I, M or G substitution.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising a variant human subgroup III consensus framework sequence modified at 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 or all of positions 27-28, 30, 33-35, 49, 57-65, 94 and 102. In one embodiment, modification is selected from the group consisting of F27Y, T28(N, P, L, S, A or D), S30(I, T or Y), A33W, M34(L, V), S35H, T57L, 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) and Y102(Q, S, H, F). In one embodiment, an antibody of the invention comprising said R94T or R94S modification further comprises one or more modifications at position 96 and/or 100. In one embodiment, said modifications comprise a G96R and/or S100T substitution (i.e., in HVR-H3).

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain comprising a variant human kappa subgroup I consensus framework sequence modified at 1, 2, 3 or all of positions 24, 25, 29 and 56. In one embodiment, modification is selected from the group consisting of R24K, A25S, I29Q and S56(R, I, M, G).

An antibody of the invention can comprise any suitable human or human consensus light chain framework sequences, provided the antibody exhibits the desired biological characteristics (e.g., a desired binding affinity). In one embodiment, an antibody of the invention comprises at least a portion (or all) of the framework sequence of human κ light chain. In one embodiment, an antibody of the invention comprises at least a portion (or all) of human κ subgroup I framework consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy and/or light chain variable domain comprising framework sequence depicted in SEQ ID NO: 13 and/or 16 (FIGURE 1), provided position 94 in the heavy chain is not R (and is preferably but not necessarily S or T).

In one aspect, an antibody of the invention is a humanized anti-c-met antibody that inhibits binding of human hepatocyte growth factor to its receptor better than a reference antibody comprising a chimeric anti-c-met antibody comprising a light chain and heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10). For example, in one embodiment, an antibody of the invention inhibits HGF binding with an IC50 value that is less than about half that of the chimeric antibody. In one embodiment, the IC50 value of an antibody of the invention is about 0.1, 0.2, 0.3 or 0.4 that of the chimeric antibody. Comparison of abilities to inhibit HGF binding to its receptor can be performed according to various methods known in the art, including as described in the Examples below. In one embodiment, IC50 values are determined across an antibody concentration range from about 0.01 nM to around 1000 nM.

In one aspect, an antibody of the invention is a humanized anti-c-met antibody that inhibits human hepatocyte growth factor (HGF) receptor activation better than a reference antibody comprising a chimeric anti-c-met antibody comprising a light chain and heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10). For example in one embodiment, an antibody of the invention inhibits receptor activation with an IC50 value that is less than about half that of the chimeric antibody. In one embodiment, the IC50 value of an antibody of the invention is about 0.1, 0.2, 0.3 or 0.4 that of the chimeric antibody. Comparison of abilities to inhibit HGF receptor

176 19
activation can be performed according to various methods known in the art, including as described in the Examples below. In one embodiment, IC50 values are determined across an antibody concentration range from about 0.1 nM to about 100 nM.

5 In one aspect, an antibody of the invention is a humanized anti-c-met antibody that inhibits c-met-dependent cell proliferation better than a reference antibody comprising a chimeric anti-c-met antibody comprising a light chain and heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10). For example, in one embodiment, an antibody of the invention inhibits cell proliferation with an IC50 value that is less than about half that of the chimeric antibody. In one embodiment, the IC50 value of an antibody of the invention is about 0.1, 0.2, 0.3 or 0.4 that of the
10 chimeric antibody. Comparison of abilities to inhibit cell proliferation can be performed according to various methods known in the art, including as described in the Examples below. In one embodiment, IC50 values are determined across an antibody concentration range from about 0.01 nM to about 100 nM.

15 In one embodiment, both the humanized antibody and chimeric antibody are monovalent. In one embodiment, both the humanized antibody and chimeric antibody comprise a single Fab region linked to an Fc region. In one embodiment, the reference chimeric antibody comprises variable domain sequences depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10) linked to a human Fc region. In one embodiment, the human Fc region is that of an IgG (e.g., IgG1, 2, 3 or 4).

20 In one aspect, the invention provides an antibody comprising a heavy chain variable domain comprising the HVR1-HC, HVR2-HC and/or HVR3-HC sequence depicted in Figure 13. In one embodiment, the variable domain comprises FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC and/or FR4-HC sequence depicted in Figure 13. In one embodiment, the antibody comprises CH1 and/or Fc sequence depicted in Figure 13. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the HVR1-HC, HVR2-HC and/or HVR3-HC sequence, and the FR1-HC, FR2-
25 HC, FR3-HC and/or FR4-HC sequence depicted in Figure 13. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the HVR1-HC, HVR2-HC and/or HVR3-HC sequence, and the CH1 and/or Fc sequence depicted in Figure 13. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the HVR1-HC, HVR2-HC and/or HVR3-HC sequence, and the FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC and/or FR4-HC
30 sequence depicted in Figure 13, and the CH1 and/or Fc sequence depicted in Figure 13. In one embodiment, the Fc region of the antibody of the invention comprises a complex between a polypeptide comprising the Fc sequence in Figure 13 and a polypeptide comprising the Fc sequence in Figure 14.

35 In one aspect, the invention provides an antibody comprising a light chain variable domain comprising HVR1-LC, HVR2-LC and/or HVR3-LC sequence depicted in Figure 13. In one embodiment, the variable domain comprises FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC and/or FR4-LC sequence

depicted in Figure 13. In one embodiment, the antibody comprises CL1 sequence depicted in Figure 13.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises light and heavy chain variable domains as described in the preceding two paragraphs. In one embodiment, the antibody is monovalent and comprises an Fc region. In one embodiment, the Fc region comprises at least one protuberance (knob) and at least one cavity (hole), wherein presence of the protuberance and cavity enhances formation of a complex between an Fc polypeptide comprising the protuberance and an Fc polypeptide comprising the cavity, for example as described in WO 2005/063816. In one embodiment, the Fc region of an antibody of the invention comprises a first and a second Fc polypeptide, wherein the first and second polypeptide each comprises one or more mutations with respect to wild type human Fc. In one embodiment, a cavity mutation is T366S, L368A and/or Y407V. In one embodiment, a protuberance mutation is T366W. In one embodiment, the first polypeptide comprises the Fc sequence depicted in Figure 13 and the second polypeptide comprises the Fc sequence depicted in Figure 14.

Antagonists of the invention can be used to modulate one or more aspects of HGF/c-met-associated effects, including but not limited to c-met activation, downstream molecular signaling (e.g., mitogen activated protein kinase (MAPK) phosphorylation), cell proliferation, cell migration, cell survival, cell morphogenesis and angiogenesis. These effects can be modulated by any biologically relevant mechanism, including disruption of ligand (e.g., HGF) binding to c-met, c-met phosphorylation and/or c-met multimerization. Accordingly, in one embodiment, the invention provides a c-met antagonist antibody that inhibits binding of HGF to c-met. In one embodiment, a c-met antagonist antibody of the invention disrupts c-met multimerization (e.g., dimerization). In one embodiment, a c-met antagonist antibody of the invention disrupts dimerization function of c-met Sema domain. In one example, a c-met antagonist antibody interferes with ability of c-met Sema domain to effect c-met dimerization. Interference can be direct or indirect. For example, a c-met antagonist antibody may bind to a sequence within the c-met Sema domain, and thereby inhibit interaction of said bound domain with its binding partner (such as another c-met molecule). In another example, a c-met antagonist antibody may bind to a sequence that is not within the c-met Sema domain, but wherein said binding results in disruption of the ability of the c-met Sema domain to interact with its binding partner (such as another c-met molecule). In one embodiment, an antagonist antibody of the invention binds to c-met (e.g., the extracellular domain) such that c-met dimerization is disrupted. In one embodiment, an antagonist antibody of the invention binds to c-met such that ability of c-met Sema domain to effect c-met dimerization is disrupted. For example, in one embodiment, the invention provides an antagonist antibody which upon binding to a c-met molecule inhibits dimerization of said molecule. In one embodiment, a c-met antagonist antibody of the invention specifically binds a sequence in the c-met Sema domain.

In one embodiment, an antagonist antibody of the invention disrupts c-met dimerization

comprising homodimerization. In one embodiment, an antagonist antibody of the invention disrupts c-met dimerization comprising heterodimerization (i.e., c-met dimerization with a non-c-met molecule).

In some instances, it may be advantageous to have a c-met antagonist antibody that does not interfere with binding of a ligand (such as HGF) to c-met. Accordingly, in one embodiment, the invention provides an antibody that does not bind an HGF binding site on c-met. In another embodiment, an antibody of the invention does not substantially inhibit HGF binding to c-met. In one embodiment, an antibody of the invention does not substantially compete with HGF for binding to c-met. In one example, an antagonist antibody of the invention can be used in conjunction with one or more other antagonists, wherein the antagonists are targeted at different processes and/or functions within the HGF/c-met axis. Thus, in one embodiment, a c-met antagonist antibody of the invention binds to an epitope on c-met distinct from an epitope bound by another c-met antagonist (such as the Fab fragment of the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number ATCC HB-11894 (hybridoma 1A3.3.13)). In another embodiment, a c-met antagonist antibody of the invention is distinct from (i.e., it is not) a Fab fragment of the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number ATCC HB-11894 (hybridoma 1A3.3.13).

In one embodiment, the invention provides a c-met antagonist antibody that disrupts both c-met multimerization and ligand binding. For example, an antagonist antibody of the invention that inhibits c-met multimerization (e.g., dimerization) may further comprise an ability to compete with HGF for binding to c-met.

In one embodiment of a c-met antagonist antibody of the invention, binding of the antagonist to c-met inhibits c-met activation by HGF. In another embodiment of a c-met antagonist antibody of the invention, binding of the antagonist to c-met in a cell inhibits proliferation, survival, scattering, morphogenesis and/or motility of the cell.

In one embodiment, a c-met antagonist antibody of the invention specifically binds at least a portion of c-met Sema domain or variant thereof. In one example, an antagonist antibody of the invention specifically binds at least one of the sequences selected from the group consisting of LDAQT (SEQ ID NO:15) (e.g., residues 269-273 of c-met), LTEKRKKRS (SEQ ID NO:16) (e.g., residues 300-308 of c-met), KPDSAEPM (SEQ ID NO:17) (e.g., residues 350-357 of c-met) and NVRCLQHF (SEQ ID NO:18) (e.g., residues 381-388 of c-met). In one embodiment, an antagonist antibody of the invention specifically binds a conformational epitope formed by part or all of at least one of the sequences selected from the group consisting of LDAQT (e.g., residues 269-273 of c-met), LTEKRKKRS (e.g., residues 300-308 of c-met), KPDSAEPM (e.g., residues 350-357 of c-met) and NVRCLQHF (e.g., residues 381-388 of c-met). In one embodiment, an antagonist antibody of the invention specifically binds an amino acid sequence having at least 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% sequence identity or similarity with the sequence LDAQT, LTEKRKKRS, KPDSAEPM and/or

NVRCLQHF.

In one embodiment, an antibody of the invention specifically binds to HGF receptor of a first animal species, and does not specifically bind to HGF receptor of a second animal species. In one embodiment, the first animal species is human and/or primate (e.g., cynomolgus monkey), and the second animal species is murine (e.g., mouse) and/or canine. In one embodiment, the first animal species is human. In one embodiment, the first animal species is primate, for example cynomolgus monkey. In one embodiment, the second animal species is murine, for example mouse. In one embodiment, the second animal species is canine.

In one aspect, the invention provides compositions comprising one or more antagonist antibodies of the invention and a carrier. In one embodiment, the carrier is pharmaceutically acceptable.

In one aspect, the invention provides nucleic acids encoding a c-met antagonist antibody of the invention.

In one aspect, the invention provides vectors comprising a nucleic acid of the invention.

In one aspect, the invention provides host cells comprising a nucleic acid or a vector of the invention. A vector can be of any type, for example a recombinant vector such as an expression vector. Any of a variety of host cells can be used. In one embodiment, a host cell is a prokaryotic cell, for example, *E. coli*. In one embodiment, a host cell is a eukaryotic cell, for example a mammalian cell such as Chinese Hamster Ovary (CHO) cell.

In one aspect, the invention provides methods for making an antagonist of the invention. For example, the invention provides a method of making a c-met antagonist antibody (which, as defined herein includes full length and fragments thereof), said method comprising expressing in a suitable host cell a recombinant vector of the invention encoding said antibody (or fragment thereof), and recovering said antibody.

In one aspect, the invention provides an article of manufacture comprising a container, and a composition contained within the container, wherein the composition comprises one or more c-met antagonist antibodies of the invention. In one embodiment, the composition comprises a nucleic acid of the invention. In one embodiment, a composition comprising an antagonist antibody further comprises a carrier, which in some embodiments is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, an article of manufacture of the invention further comprises instructions for administering the composition (e.g., the antagonist antibody) to a subject.

In one aspect, the invention provides a kit comprising a first container comprising a composition comprising one or more c-met antagonist antibodies of the invention; and a second container comprising a buffer. In one embodiment, the buffer is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, a composition comprising an antagonist antibody further comprises a carrier, which in some embodiments is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, a kit further comprises instructions for administering the composition (e.g., the antagonist antibody) to a subject.

In one aspect, the invention provides use of a c-met antagonist antibody of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as a cancer, a tumor, a cell proliferative disorder, an immune (such as autoimmune) disorder and/or an angiogenesis-related disorder.

5 In one aspect, the invention provides use of a nucleic acid of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as a cancer, a tumor, a cell proliferative disorder, an immune (such as autoimmune) disorder and/or an angiogenesis-related disorder.

10 In one aspect, the invention provides use of an expression vector of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as a cancer, a tumor, a cell proliferative disorder, an immune (such as autoimmune) disorder and/or an angiogenesis-related disorder.

15 In one aspect, the invention provides use of a host cell of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as a cancer, a tumor, a cell proliferative disorder, an immune (such as autoimmune) disorder and/or an angiogenesis-related disorder.

20 In one aspect, the invention provides use of an article of manufacture of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as a cancer, a tumor, a cell proliferative disorder, an immune (such as autoimmune) disorder and/or an angiogenesis-related disorder.

In one aspect, the invention provides use of a kit of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as a cancer, a tumor, a cell proliferative disorder, an immune (such as autoimmune) disorder and/or an angiogenesis-related disorder.

25 The invention provides methods and compositions useful for modulating disease states associated with dysregulation of the HGF/c-met signaling axis. The HGF/c-met signaling pathway is involved in multiple biological and physiological functions, including, e.g., cell proliferation and angiogenesis. Thus, in one aspect, the invention provides a method comprising administering to a subject an antibody of the invention.

30 In one aspect, the invention provides a method of inhibiting c-met activated cell proliferation, said method comprising contacting a cell or tissue with an effective amount of a antibody of the invention, whereby cell proliferation associated with c-met activation is inhibited.

35 In one aspect, the invention provides a method of treating a pathological condition associated with dysregulation of c-met activation in a subject, said method comprising administering to the subject an effective amount of an antibody of the invention, whereby said condition is treated.

In one aspect, the invention provides a method of inhibiting the growth of a cell that expresses c-met or hepatocyte growth factor, or both, said method comprising contacting said cell with an

antibody of the invention thereby causing an inhibition of growth of said cell. In one embodiment, the cell is contacted by HGF expressed by a different cell (e.g., through a paracrine effect).

In one aspect, the invention provides a method of therapeutically treating a mammal having a cancerous tumor comprising a cell that expresses c-met or hepatocyte growth factor, or both, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an antibody of the invention, thereby effectively treating said mammal. In one embodiment, the cell is contacted by HGF expressed by a different cell (e.g., through a paracrine effect).

In one aspect, the invention provides a method for treating or preventing a cell proliferative disorder associated with increased expression or activity of c-met or hepatocyte growth, or both, said method comprising administering to a subject in need of such treatment an effective amount of an antibody of the invention, thereby effectively treating or preventing said cell proliferative disorder. In one embodiment, said proliferative disorder is cancer.

In one aspect, the invention provides a method for inhibiting the growth of a cell, wherein growth of said cell is at least in part dependent upon a growth potentiating effect of c-met or hepatocyte growth factor, or both, said method comprising contacting said cell with an effective amount of an antibody of the invention, thereby inhibiting the growth of said cell. In one embodiment, the cell is contacted by HGF expressed by a different cell (e.g., through a paracrine effect).

A method of therapeutically treating a tumor in a mammal, wherein the growth of said tumor is at least in part dependent upon a growth potentiating effect of c-met or hepatocyte growth factor, or both, said method comprising contacting said cell with an effective amount of an antibody of the invention, thereby effectively treating said tumor. In one embodiment, the cell is contacted by HGF expressed by a different cell (e.g., through a paracrine effect).

Methods of the invention can be used to affect any suitable pathological state, for example, cells and/or tissues associated with dysregulation of the HGF/c-met signaling pathway. In one embodiment, a cell that is targeted in a method of the invention is a cancer cell. For example, a cancer cell can be one selected from the group consisting of a breast cancer cell, a colorectal cancer cell, a lung cancer cell, a papillary carcinoma cell (e.g., of the thyroid gland), a colon cancer cell, a pancreatic cancer cell, an ovarian cancer cell, a cervical cancer cell, a central nervous system cancer cell, an osteogenic sarcoma cell, a renal carcinoma cell, a hepatocellular carcinoma cell, a bladder cancer cell, a gastric carcinoma cell, a head and neck squamous carcinoma cell, a melanoma cell and a leukemia cell. In one embodiment, a cell that is targeted in a method of the invention is a hyperproliferative and/or hyperplastic cell. In one embodiment, a cell that is targeted in a method of the invention is a dysplastic cell. In yet another embodiment, a cell that is targeted in a method of the invention is a metastatic cell.

Methods of the invention can further comprise additional treatment steps. For example, in one embodiment, a method further comprises a step wherein a targeted cell and/or tissue (e.g., a

cancer cell) is exposed to radiation treatment or a chemotherapeutic agent.

As described herein, c-met activation is an important biological process the dysregulation of which leads to numerous pathological conditions. Accordingly, in one embodiment of methods of the invention, a cell that is targeted (e.g., a cancer cell) is one in which activation of c-met is enhanced as compared to a normal cell of the same tissue origin. In one embodiment, a method of the invention causes the death of a targeted cell. For example, contact with an antagonist of the invention may result in a cell's inability to signal through the c-met pathway, which results in cell death.

Dysregulation of c-met activation (and thus signaling) can result from a number of cellular changes, including, for example, overexpression of HGF (c-met's cognate ligand) and/or c-met itself. Accordingly, in some embodiments, a method of the invention comprises targeting a cell wherein c-met or hepatocyte growth factor, or both, is more abundantly expressed by said cell (e.g., a cancer cell) as compared to a normal cell of the same tissue origin. A c-met-expressing cell can be regulated by HGF from a variety of sources, i.e. in an autocrine or paracrine manner. For example, in one embodiment of methods of the invention, a targeted cell is contacted/bound by hepatocyte growth factor expressed in a different cell (e.g., via a paracrine effect). Said different cell can be of the same or of a different tissue origin. In one embodiment, a targeted cell is contacted/bound by HGF expressed by the targeted cell itself (e.g., via an autocrine effect/loop). C-met activation and/or signaling can also occur independent of ligand. Hence, in one embodiment of methods of the invention, c-met activation in a targeted cell occurs independent of ligand.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 depicts alignment of sequences of the variable light and heavy chains for the following: light chain human subgroup I consensus sequence, heavy chain human subgroup III consensus sequence, murine 5D5 anti-c-met antibody and 5D5-grafted "humanized" antibody.

FIG. 2 depicts various HVR sequences of selected affinity-matured antibodies from libraries with individually-randomized HVR.

FIG. 3 depicts HVR-H3 sequences of selected affinity-matured antibodies from a library pool comprising a combination of 6 libraries encompassing all six HVRs wherein each library is randomized in a single HVR.

FIG. 4 depicts results of Biacore analysis of selected anti-c-met antibodies.

FIG. 5A,B & 6A,B depict exemplary acceptor human consensus framework sequences for use in practicing the instant invention with sequence identifiers as follows:

Variable heavy (VH) consensus frameworks (FIG. 5A, B)

human VH subgroup I consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:19)

human VH subgroup I consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:20-22)

human VH subgroup II consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:23)

human VH subgroup II consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:24-26)

human VH subgroup III consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:27)

5 human VH subgroup III consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:28-30)

human VH acceptor framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:31)

human VH acceptor framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:32-33)

human VH acceptor 2 framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:34)

10 human VH acceptor 2 framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:35-37)

Variable light (VL) consensus frameworks (FIG. 6A,B)

human VL kappa subgroup I consensus framework (SEQ ID NO:38)

human VL kappa subgroup II consensus framework (SEQ ID NO:39)

human VL kappa subgroup III consensus framework (SEQ ID NO:40)

15 human VL kappa subgroup IV consensus framework (SEQ ID NO:41)

FIG. 7 depicts donor (murine antibody 5D5) light chain (LC) and heavy chain (HC) variable domain sequences.

FIG. 8 depicts graphical data for blocking of HGF binding to its receptor by an antibody of the invention.

20 FIG. 9 depicts graphical data for inhibition of HGF receptor activation by an antibody of the invention.

FIG. 10 depicts graphical data for inhibition of cell proliferation by an antibody of the invention. "rchOA5D5 HGF" refers to chimeric one-armed 5D5 antibody plus HGF; "rhOA5D5v2 HGF" refers to OA5D5.v2 plus HGF; "rhOA5D5v1 HGF" refers to OA5D5.v1 plus HGF. "rchOA5D5 Control" refers to chimeric one-armed 5D5 antibody without HGF; "rhOA5D5v2 Control" refers to OA5D5.v2 without HGF; "rhOA5D5v1 Control" refers to OA5D5.v1 without HGF".

FIG. 11A, B depicts data for inhibition of receptor phosphorylation in the presence of an antibody of the invention. Fig. 11A depicts receptor phosphorylation of H358 cells. Fig. 11B depicts receptor phosphorylation of H358 cells transfected with HGF.

30 Fig. 12 depicts graphical data showing *in vivo* efficacy of an antibody of the invention. "TI" refers to tumor incidence. TI=8/10 refers to 8 mice having tumors out of a group of 10 mice. TI=2/8 refers to 2 mice having tumors out of a group of 8 mice.

FIG. 13 depicts amino acid sequences of the framework (FR), hypervariable region (HVR), first constant domain (CL or CH1) and Fc region (Fc) of one embodiment of an antibody of the invention (5D5.v2). The Fc sequence depicted comprises "hole" (cavity) mutations T366S, L368A and Y407V, as described in WO 2005/063816.

FIG. 14 depicts sequence of an Fc polypeptide comprising "knob" (protuberance) mutation

T366W, as described in WO 2005/063816. In one embodiment, an Fc polypeptide comprising this sequence forms a complex with an Fc polypeptide comprising the Fc sequence of Fig. 13 to generate an Fc region of an antibody of the invention.

5

MODES FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The invention provides methods, compositions, kits and articles of manufacture for identifying and/or using inhibitors of the HGF/c-met signaling pathway.

Details of these methods, compositions, kits and articles of manufacture are provided herein.

General Techniques

10

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, biochemistry, and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature, such as, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 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 et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

15

Definitions

20

A "modification" of an amino acid residue/position, as used herein, refers to a change of a primary amino acid sequence as compared to a starting amino acid sequence, wherein the change results from a sequence alteration involving said amino acid residue/positions. For example, typical modifications include substitution of the residue (or at said position) with another amino acid (e.g., a conservative or non-conservative substitution), insertion of one or more (generally fewer than 5 or 3) amino acids adjacent to said residue/position, and deletion of said residue/position. An "amino acid substitution", or variation thereof, refers to the replacement of an existing amino acid residue in a predetermined (starting) amino acid sequence with a different amino acid residue. Generally and preferably, the modification results in alteration in at least one physicochemical activity of the variant polypeptide compared to a polypeptide comprising the starting (or "wild type") amino acid sequence. For example, in the case of an antibody, a physicochemical activity that is altered can be binding affinity, binding capability and/or binding effect upon a target molecule.

25

30

35

An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at

least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present.

5 Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

The term "variable domain residue numbering as in Kabat" or "amino acid position numbering as in Kabat", and variations thereof, refers to the numbering system used for heavy chain variable domains or light chain variable domains of the compilation of antibodies in Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Using this numbering system, the actual linear amino acid sequence
10 may contain fewer or additional amino acids corresponding to a shortening of, or insertion into, a FR or CDR of the variable domain. For example, a heavy chain variable domain may include a single amino acid insert (residue 52a according to Kabat) after residue 52 of H2 and inserted residues (e.g. residues 82a, 82b, and 82c, etc according to Kabat) after heavy chain FR residue 82. The Kabat
15 numbering of residues may be determined for a given antibody by alignment at regions of homology of the sequence of the antibody with a "standard" Kabat numbered sequence.

The phrase "substantially similar," or "substantially the same", as used herein, denotes a sufficiently high degree of similarity between two numeric values (generally one associated with an antibody of the invention and the other associated with a reference/comparator antibody) such that
20 one of skill in the art would consider the difference between the two values to be of little or no biological and/or statistical significance within the context of the biological characteristic measured by said values (e.g., Kd values). The difference between said two values is preferably less than about 50%, preferably less than about 40%, preferably less than about 30%, preferably less than about 20%, preferably less than about 10% as a function of the value for the reference/comparator antibody.

"Binding affinity" generally refers to the strength of the sum total of noncovalent interactions
25 between a single binding site of a molecule (e.g., an antibody) and its binding partner (e.g., an antigen). Unless indicated otherwise, as used herein, "binding affinity" refers to intrinsic binding affinity which reflects a 1:1 interaction between members of a binding pair (e.g., antibody and antigen). The affinity of a molecule X for its partner Y can generally be represented by the
30 dissociation constant (Kd). Affinity can be measured by common methods known in the art, including those described herein. Low-affinity antibodies generally bind antigen slowly and tend to dissociate readily, whereas high-affinity antibodies generally bind antigen faster and tend to remain bound longer. A variety of methods of measuring binding affinity are known in the art, any of which can be used for purposes of the present invention. Specific illustrative embodiments are described in
35 the following.

In one embodiment, the "Kd" or "Kd value" according to this invention is measured by a radiolabeled antigen binding assay (RIA) performed with the Fab version of an antibody of interest

29

and its antigen as described by the following assay that measures solution binding affinity of Fabs for antigen by equilibrating Fab with a minimal concentration of (125 I)-labeled antigen in the presence of a titration series of unlabeled antigen, then capturing bound antigen with an anti-Fab antibody-coated plate (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). To establish conditions for the assay, microtiter plates (Dynex) are coated overnight with 5 ug/ml of a capturing anti-Fab antibody (Cappel Labs) in 50 mM sodium carbonate (pH 9.6), and subsequently blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin in PBS for two to five hours at room temperature (approximately 23°C). In a non-adsorbant plate (Nunc #269620), 100 pM or 26 pM [125 I]-antigen are mixed with serial dilutions of a Fab of interest (e.g., consistent with assessment of an anti-VEGF antibody, Fab-12, in Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). The Fab of interest is then incubated overnight; however, the incubation may continue for a longer period (e.g., 65 hours) to insure that equilibrium is reached. Thereafter, the mixtures are transferred to the capture plate for incubation at room temperature (e.g., for one hour). The solution is then removed and the plate washed eight times with 0.1% Tween-20 in PBS. When the plates have dried, 150 ul/well of scintillant (MicroScint-20; Packard) is added, and the plates are counted on a Topcount gamma counter (Packard) for ten minutes. Concentrations of each Fab that give less than or equal to 20% of maximal binding are chosen for use in competitive binding assays. According to another embodiment the K_d or K_d value is measured by using surface plasmon resonance assays using a BIAcoreTM-2000 or a BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5ug/ml (~0.2uM) before injection at a flow rate of 5ul/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of antigen, 1M ethanolamine is injected to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25ul/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) is calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, e.g., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. If the on-rate exceeds $10^6 M^{-1} S^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate can be determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm; emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stir red

30

cuvette.

An "on-rate" or "rate of association" or "association rate" or " k_{on} " according to this invention can also be determined with the same surface plasmon resonance technique described above using a BIAcoreTM-2000 or a BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5ug/ml (~0.2uM) before injection at a flow rate of 5ul/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of 1M ethanolamine to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25ul/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) was calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, e.g., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. However, if the on-rate exceeds $10^6 M^{-1} S^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate is preferably determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm; emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stirred cuvette. The " K_d " or " K_d value" according to this invention is in one embodiment measured by a radiolabeled antigen binding assay (RIA) performed with the Fab version of the antibody and antigen molecule as described by the following assay that measures solution binding affinity of Fabs for antigen by equilibrating Fab with a minimal concentration of (^{125}I)-labeled antigen in the presence of a titration series of unlabeled antigen, then capturing bound antigen with an anti-Fab antibody-coated plate (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). To establish conditions for the assay, microtiter plates (Dynex) are coated overnight with 5 ug/ml of a capturing anti-Fab antibody (Cappel Labs) in 50 mM sodium carbonate (pH 9.6), and subsequently blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin in PBS for two to five hours at room temperature (approximately 23°C). In a non-adsorbant plate (Nunc #269620), 100 pM or 26 pM [^{125}I]-antigen are mixed with serial dilutions of a Fab of interest (consistent with assesment of an anti-VEGF antibody, Fab-12, in Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). The Fab of interest is then incubated overnight; however, the incubation may continue for a longer period (e.g., 65 hours) to insure that equilibrium is reached. Thereafter, the mixtures are transferred to the capture plate for incubation at room temperature for one hour. The solution is then removed and the plate

washed eight times with 0.1% Tween-20 in PBS. When the plates have dried, 150 μ l/well of scintillant (MicroScint-20; Packard) is added, and the plates are counted on a Topcount gamma counter (Packard) for ten minutes. Concentrations of each Fab that give less than or equal to 20% of maximal binding are chosen for use in competitive binding assays. According to another embodiment, the K_d or K_d value is measured by using surface plasmon resonance assays using a BIAcore™-2000 or a BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5 μ g/ml (~0.2 μ M) before injection at a flow rate of 5 μ l/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of antigen, 1M ethanolamine is injected to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25 μ l/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) is calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, e.g., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. If the on-rate exceeds $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate can be determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm; emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stir red cuvette.

In one embodiment, an "on-rate" or "rate of association" or "association rate" or " k_{on} " according to this invention is determined with the same surface plasmon resonance technique described above using a BIAcore™-2000 or a BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5 μ g/ml (~0.2 μ M) before injection at a flow rate of 5 μ l/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of 1M ethanolamine to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25 μ l/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model

(BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) was calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, e.g., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. However, if the on-rate exceeds $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate is preferably determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm; emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stirred cuvette.

The phrase "substantially reduced," or "substantially different", as used herein, denotes a sufficiently high degree of difference between two numeric values (generally one associated with an antibody of the invention and the other associated with a reference/comparator antibody) such that one of skill in the art would consider the difference between the two values to be of statistical significance within the context of the biological characteristic measured by said values (e.g., K_d values, HAMA response). The difference between said two values is preferably greater than about 10%, preferably greater than about 20%, preferably greater than about 30%, preferably greater than about 40%, preferably greater than about 50% as a function of the value for the reference/comparator antibody.

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to a peptide or polypeptide sequence is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the specific peptide or polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table A below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table A below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Figure 8 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program.

Table 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 = 0

*/

#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},

34 39

```

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 */

5
struct diag {
    int      score; /* score at last jmp */
    long     offset; /* offset of prev block */
    short    ijmp; /* current jmp index */
10    struct jmp jp; /* list of jmps */
};

struct path {
    int      spc; /* number of leading spaces */
15    short    n[JMPs]; /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPs]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char      *ofile; /* output file name */
20 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 */
25 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 */
30 int      amax; /* 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 */
35
char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char      *getseq(), *g_calloc();

```

5

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
```

```
*
```

```
* usage: prog file1 file2
```

```
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
```

10

```
* 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"
```

15

```
*
```

```
* 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"
```

20

```
#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
```

```
};
```

25

```
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,
```

30

```
1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
```

```
};
```

```
main(ac, av)
```

```
main
```

```
int ac;
```

35

```
char *av[];
```

```
{
```

```
prog = av[0];
```

37

36

```
    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");
5       fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
10    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

15    endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";        /* output file */

    nw();                      /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();                /* get the actual jmps */
20    print();                  /* print stats, alignment */

    cleanup(0);                /* unlink any tmp files */
}

25

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
30 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                nw
35 {
    char      *px, *py;            /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely; /* keep track of dely */

```

30

```

int      ndelx, delx;    /* keep track of delx */
int      *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
int      mis;           /* score for each type */
int      ins0, ins1;     /* insertion penalties */
5  register      id;      /* diagonal index */
register      ij;        /* jmp index */
register      *col0, *col1; /* score for curr, last row */
register      xx, yy;     /* index into seqs */

10  dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
15  col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

smax = -10000;
20  if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
25  col0[0] = 0;    /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

30  /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
35  */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)

```

36 39

```

        col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
    else
        col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
    ndelx = xx;
5      }
    else {
        col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
10     }

...NW

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
15     mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];
20

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
25     if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
30             dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
35             dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
    
```

```
        ndely[yy]++;  
    }  
  
    /* update penalty for del in y seq;  
    * favor new del over ongong del  
    */  
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {  
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {  
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);  
            ndelx = 1;  
        } else {  
            delx -= ins1;  
            ndelx++;  
        }  
    } else {  
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {  
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);  
            ndelx = 1;  
        } else  
            ndelx++;  
    }  
  
    /* pick the maximum score; we're favoring  
    * mis over any del and delx over dely  
    */  
  
    id = xx - yy + len1 - 1;  
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])  
        col1[yy] = mis;  
    else if (delx >= dely[yy]) {
```

```

col1[yy] = delx;
ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndelx >= MAXJMP
&& xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
5      dx[id].ijmp++;
      if (++ij >= MAXJMP) {
          writejumps(id);
          ij = dx[id].ijmp = 0;
          dx[id].offset = offset;
10      offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
      }
  }
  dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
  dx[id].jp.x[ij] = xx;
15  dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
20  if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
25        dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
30  dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
35    /* last col
    */
    if (endgaps)

```

112

```

coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
if (coll[yy] > smax) {
    smax = coll[yy];
    dmax = id;
5      }
    }
    }
    if (endgaps && xx < len0)
        coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
10    if (coll[yy-1] > smax) {
        smax = coll[yy-1];
        dmax = id;
    }
    tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
15 }
    (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)coll);
20 }

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
25 * 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()
30 * 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
 */

35 #include "nw.h"

#define SPC 3

```

```

#define P_LINE      256    /* maximum output line */
#define P_SPC 3      /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];

5  int    olen;          /* set output line length */
   FILE  *fx;            /* output file */

   print()                                print
   {
10      int    lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

      if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
          fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
          cleanup(1);
15      }
      fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
      fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
      olen = 60;
      lx = len0;
20      ly = len1;
      firstgap = lastgap = 0;
      if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
          pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
          ly -= pp[0].spc;
25      }
      else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
          pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
          lx -= pp[1].spc;
      }
30      if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
          lastgap = len0 - dmax0 - 1;
          lx -= lastgap;
      }
      else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
35      lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
          ly -= lastgap;
      }
   }

```

44

```

    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align0;
}

```

5

/*

* trace back the best path, count matches

*/

10

static

getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)

getmat

int lx, ly;

/* "core" (minus endgaps) */

int firstgap, lastgap;

/* leading trailing overlap */

15

{

int nm, i0, i1, siz0, siz1;

char outx[32];

double pct;

register n0, n1;

20

register char *p0, *p1;

/* get total matches, score

*/

i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;

25

p0 = seqx[0] + pp[1].spc;

p1 = seqx[1] + pp[0].spc;

n0 = pp[1].spc + 1;

n1 = pp[0].spc + 1;

30

nm = 0;

while (*p0 && *p1) {

if (siz0) {

p1++;

n1++;

35

siz0--;

}

else if (siz1) {

45

```

        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
5      else {
        if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
10      if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
15  }

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
20  */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
25  pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
30

    fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
    if (gapx) {
35      (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);

```

...getmat

46



```

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
5          ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
10      "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
15      "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        amax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
20      lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

25  static      nm;          /* matches in core -- for checking */
    static      lmax;        /* 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 */
30  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() */
35

/*
* print alignment of described in struct path pp[]

```

47

```

    */
    static
    pr_align()
    {
5         int          nn;    /* char count */
        int          more;
        register      i;

        for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
10             nn = stripname(namecx[i]);
            if (nn > lmax)
                lmax = nn;

            nc[i] = 1;
15             .ni[i] = 1;
            siz[i] = ij[i] = 0;
            ps[i] = seqx[i];
            po[i] = out[i];        }

20
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
            for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                /*
                 * do we have more of this sequence?
25                 */
                if (!*ps[i])
                    continue;

                more++;

30
                if (pp[i].spc) { /* leading space */
                    *po[i]++ = ' ';
                    pp[i].spc--;
                }
            }
            else if (siz[i]) { /* in a gap */
35                 *po[i]++ = '-';
                siz[i]--;
            }
        }
    }
}

```

...pr_align

418

```

    }
    else {          /* we're putting a seq element
                    */
        *po[i] = *ps[i];
5       if (islower(*ps[i]))
            *ps[i] = toupper(*ps[i]);
        po[i]++;
        ps[i]++;

10        /*
        * are we at next gap for this seq?
        */
        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
15         * we need to merge all gaps
            * at this location
            */
            siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
            while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
20                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
        }
        ni[i]++;
    }
}
}
25 if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
    nn = 0;
30 }
}

/*
35 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
*/
static

```

dumpblock()

dumpblock

{

register i;

5 for (i = 0; i < 2; i++)
*po[i] = '\0';

..dumpblock

10 (void) putc('\n', fx);

for (i = 0; i < 2; i++) {

if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {

if (i == 0)

nums(i);

15 if (i == 0 && *out[1])
stars();

putline(i);

if (i == 0 && *out[1])

fprintf(fx, star);

20 if (i == 1)

nums(i);

}

}

}

25

/*

* put out a number line: dumpblock()

*/

static

30 nums(ix)

nums

int ix; /* index in out[] holding seq line */

{

char nline[P_LINE];

register i, j;

35 register char *pn, *px, *py;

for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)

49

50

```

        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
5         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';
10                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
15                i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
20    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

25 /*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
30     int     ix;
    {

        int     i;
35     register char  *px;

    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)

```

putline

...putline

51

```

        (void) putc(*px, fx);
    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
        (void) putc(' ', fx);

5      /* these count from 1:
       * ni[] is current element (from 1)
       * nc[] is number at start of current line
       */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
10      (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

15 /*
   * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
   */
static
stars()                                stars
20 {
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == '' && *(po[0]) == ' ') ||
25     !*out[1] || (*out[1] == '' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

30    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
35                cx = '*';
                nm++;
            }
        }
    }
}

```

52

```

    else if (ldna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
        cx = ':';
    else
        cx = ':';

5          }
    else
        cx = ':';
        *px++ = cx;
    }
10    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

15    . . . . .

/*
20    * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
    */
    static
    stripname(pn)                                stripname
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
25    {
        register char    *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
            if (*px == '/')
30                py = px + 1;

        if (py)
            (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));
35    }
}
```

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
5  * 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"
10 #include <sys/file.h>

char  *jname = "/tmp/homgXXXXXX";      /* tmp file for jumps */
FILE  *fj;

15 int  cleanup();                      /* cleanup tmp file */
long  lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
20 */
cleanup(i)                                cleanup
    int    i;
{
    if (fj)
25         (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
30 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char  *
35 gstseq(file, len)                      getseq
    char  *file; /* file name */
    int   *len;  /* seq len */
```

```
{
    char        line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int         natgc, tlen;
5    FILE        *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
10    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
15        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
20        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

25

                                                                    ...getseq

    py = pseq + 4;
    *len = tlen;
30    rewind(fp);

    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
35        for (px = line; *px != '\n'; px++) {
            if (isupper(*px))
                *py++ = *px;
```

55

```

        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU",*(py-1)))
            natgc++;
5          }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
10      dna = natgc > (flen/3);
        return(pseq+4);
    }

    char *
15  g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
        char *msg;    /* program, calling routine */
        int  nx, sz;   /* number and size of elements */
    {
        char *px, *calloc();
20      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);
25                exit(1);
            }
        }
        return(px);
    }
30
    /*
    * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
    */
    readjmps()                                readjmps
35  {
        int fd = -1;
        int siz, i0, i1;

```

56



register i, j, xx;

if (fj) {

(void) fclose(fj);

5

if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {

fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);

cleanup(1);

}

}

10

for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {

while (1) {

for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

;

15

...readjumps

if (j < 0 && dx[dmax].offset && 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));

20

dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;

}

else

break;

}

25

if (i >= JMPS) {

fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);

cleanup(1);

}

if (j >= 0) {

30

siz = dx[dmax].jp.n[j];

xx = dx[dmax].jp.x[j];

dmax += siz;

if (siz < 0) { /* gap in second seq */

pp[1].n[i1] = -siz;

35

xx += siz;

/* id = xx - yy + len1 - 1

*/

57

```

        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
5         siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
10        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
15        i0++;
    }
}
else
    break;
20 }

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
25     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 < i1; j++, i1--) {
30     i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
35     (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;

```

```

    }
    }

/*
5  * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
  */
  writejumps(ix)                                writejumps
    int    ix;
  {
10    char  *mktemp();

    if (!f) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
15            cleanup(1);
        }
        if ((f = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
20        }
    }

    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, f);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, f);

```

25

The term "vector," as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a phage vector. Another type of vector is a viral vector, wherein

30 additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable

35 of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "recombinant vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In

59

the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector.

"Polynucleotide," or "nucleic acid," as used interchangeably herein, refer to polymers of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a polymer by DNA or RNA polymerase, or by a synthetic reaction. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and their analogs. If present, modification to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the polymer. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after synthesis, such as by conjugation with a label. Other types of modifications include, for example, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoamidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those containing pendant moieties, such as, for example, proteins (e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), those containing chelators (e.g., metals, radioactive metals, boron, oxidative metals, etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (e.g., alpha anomeric nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotide(s). Further, any of the hydroxyl groups ordinarily present in the sugars may be replaced, for example, by phosphonate groups, phosphate groups, protected by standard protecting groups, or activated to prepare additional linkages to additional nucleotides, or may be conjugated to solid or semi-solid supports. The 5' and 3' terminal OH can be phosphorylated or substituted with amines or organic capping group moieties of from 1 to 20 carbon atoms. Other hydroxyls may also be derivatized to standard protecting groups. Polynucleotides can also contain analogous forms of ribose or deoxyribose sugars that are generally known in the art, including, for example, 2'-O-methyl-, 2'-O-allyl, 2'-fluoro- or 2'-azido-ribose, carbocyclic sugar analogs, alpha-anomeric sugars, epimeric sugars such as arabinose, xyloses or lyxoses, pyranose sugars, furanose sugars, sedoheptuloses, acyclic analogs and abasic nucleoside analogs such as methyl riboside. One or more phosphodiester linkages may be replaced by alternative linking groups. These alternative linking groups include, but are not limited to, embodiments wherein phosphate is replaced by P(O)S("thioate"), P(S)S("dithioate"), "(O)NR₂("amidate"), P(O)R, P(O)OR', CO or CH₂("formacetal"), in which each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted alkyl (1-20 C.) optionally containing an ether (-O-) linkage, aryl, alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl or araldyl. Not all linkages in a polynucleotide need be identical. The preceding description applies to all polynucleotides referred to herein, including RNA and DNA.

"Oligonucleotide," as used herein, generally refers to short, generally single stranded, generally synthetic polynucleotides that are generally, but not necessarily, less than about 200

60

nucleotides in length. The terms "oligonucleotide" and "polynucleotide" are not mutually exclusive. The description above for polynucleotides is equally and fully applicable to oligonucleotides.

The term "hepatocyte growth factor" or "HGF", as used herein, refers, unless specifically or contextually indicated otherwise, to any native or variant (whether native or synthetic) HGF polypeptide that is capable of activating the HGF/c-met signaling pathway under conditions that permit such process to occur. The term "wild type HGF" generally refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of a naturally occurring HGF protein. The term "wild type HGF sequence" generally refers to an amino acid sequence found in a naturally occurring HGF.

The terms "antibody" and "immunoglobulin" are used interchangeably in the broadest sense and include monoclonal antibodies (e.g., full length or intact monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multivalent antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies so long as they exhibit the desired biological activity) and may also include certain antibody fragments (as described in greater detail herein). An antibody can be human, humanized and/or affinity matured.

"Antibody fragments" comprise only a portion of an intact antibody, wherein the portion preferably retains at least one, preferably most or all, of the functions normally associated with that portion when present in an intact antibody. In one embodiment, an antibody fragment comprises an antigen binding site of the intact antibody and thus retains the ability to bind antigen. In another embodiment, an antibody fragment, for example one that comprises the Fc region, retains at least one of the biological functions normally associated with the Fc region when present in an intact antibody, such as FcRn binding, antibody half life modulation, ADCC function and complement binding. In one embodiment, an antibody fragment is a monovalent antibody that has an in vivo half life substantially similar to an intact antibody. For example, such an antibody fragment may comprise an antigen binding arm linked to an Fc sequence capable of conferring in vivo stability to the fragment. In one embodiment, an antibody of the invention is a one-armed antibody as described in WO2005/063816. In one embodiment, the one-armed antibody comprises Fc mutations constituting "knobs" and "holes" as described in WO2005/063816. For example, a hole mutation can be one or more of T366A, L368A and/or Y407V in an Fc polypeptide, and a cavity mutation can be T366W.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigen. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations that typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass,

while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

5 "Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity,
10 affinity, and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable
15 domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally will also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); and
20 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). See also the following review articles and references cited therein: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

An "antigen" is a predetermined antigen to which an antibody can selectively bind. The
25 target antigen may be polypeptide, carbohydrate, nucleic acid, lipid, hapten or other naturally occurring or synthetic compound. Preferably, the target antigen is a polypeptide. An "acceptor human framework" for the purposes herein is a framework comprising the amino acid sequence of a VL or VH framework derived from a human immunoglobulin framework, or from a human consensus framework. An acceptor human framework "derived from" a human immunoglobulin framework or
30 human consensus framework may comprise the same amino acid sequence thereof, or may contain pre-existing amino acid sequence changes. Where pre-existing amino acid changes are present, preferably no more than 5 and preferably 4 or less, or 3 or less, pre-existing amino acid changes are present. Where pre-existing amino acid changes are present in a VH, preferably those changes are only at three, two or one of positions 71H, 73H and 78H; for instance, the amino acid residues at
35 those positions may be 71A, 73T and/or 78A. In one embodiment, the VL acceptor human framework is identical in sequence to the VL human immunoglobulin framework sequence or human consensus framework sequence.

A "human consensus framework" is a framework which represents the most commonly occurring amino acid residue in a selection of human immunoglobulin VL or VH framework sequences. Generally, the selection of human immunoglobulin VL or VH sequences is from a subgroup of variable domain sequences. Generally, the subgroup of sequences is a subgroup as in Kabat *et al.* In one embodiment, for the VL, the subgroup is subgroup kappa I as in Kabat *et al.* In one embodiment, for the VH, the subgroup is subgroup III as in Kabat *et al.*

A "VH subgroup III consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable heavy subgroup III of Kabat *et al.* In one embodiment, the VH subgroup III consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences: HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:43)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:44)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45).

A "VL subgroup I consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable light kappa subgroup I of Kabat *et al.* In one embodiment, the VL subgroup I consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC (SEQ ID NO:46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:48)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:49).

An "unmodified human framework" is a human framework which has the same amino acid sequence as the acceptor human framework, *e.g.* lacking human to non-human amino acid substitution(s) in the acceptor human framework.

An "altered hypervariable region" for the purposes herein is a hypervariable region comprising one or more (*e.g.* one to about 16) amino acid substitution(s) therein.

An "un-modified hypervariable region" for the purposes herein is a hypervariable region having the same amino acid sequence as a non-human antibody from which it was derived, *i.e.* one which lacks one or more amino acid substitutions therein.

63

The term "hypervariable region", "HVR", or "HV", when used herein refers to the regions of an antibody variable domain which are hypervariable in sequence and/or form structurally defined loops. Generally, antibodies comprise six hypervariable regions; three in the VH (H1, H2, H3), and three in the VL (L1, L2, L3). A number of hypervariable region delineations are in use and are encompassed herein. The Kabat Complementarity Determining Regions (CDRs) are based on sequence variability and are the most commonly used (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia refers instead to the location of the structural loops (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). The AbM hypervariable regions represent a compromise between the Kabat CDRs and Chothia structural loops, and are used by Oxford Molecular's AbM antibody modeling software. The "contact" hypervariable regions are based on an analysis of the available complex crystal structures. The residues from each of these hypervariable regions are noted below.

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
	---	---	---	---
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
(Kabat Numbering)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia Numbering)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Hypervariable regions may comprise "extended hypervariable regions" as follows: 24-36 or 24-34 (L1), 46-56 or 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the VL and 26-35 (H1), 50-65 or 49-65 (H2) and 93-102, 94-102 or 95-102 (H3) in the VH. The variable domain residues are numbered according to Kabat *et al.*, *supra* for each of these definitions.

"Framework" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined.

A "human antibody" is one which possesses an amino acid sequence which corresponds to that of an antibody produced by a human and/or has been made using any of the techniques for making human antibodies as disclosed herein. This definition of a human antibody specifically excludes a humanized antibody comprising non-human antigen-binding residues.

An "affinity matured" antibody is one with one or more alterations in one or more CDRs thereof which result in an improvement in the affinity of the antibody for antigen, compared to a parent antibody which does not possess those alteration(s). Preferred affinity matured antibodies will

64

have nanomolar or even picomolar affinities for the target antigen. Affinity matured antibodies are produced by procedures known in the art. Marks *et al.* *BioTechnology* 10:779-783 (1992) describes affinity maturation by VH and VL domain shuffling. Random mutagenesis of CDR and/or framework residues is described by: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

A "blocking" antibody or an "antagonist" antibody is one which inhibits or reduces biological activity of the antigen it bind. Preferred blocking antibodies or antagonist antibodies substantially or completely inhibit the biological activity of the antigen.

An "agonist antibody", as used herein, is an antibody which mimics at least one of the functional activities of a polypeptide of interest.

A "disorder" is any condition that would benefit from treatment with a substance/molecule or method of the invention. This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question. Non-limiting examples of disorders to be treated herein include malignant and benign tumors; non-leukemias and lymphoid malignancies; neuronal, glial, astrocytal, hypothalamic and other glandular, macrophagal, epithelial, stromal and blastocoelic disorders; and inflammatory, immunologic and other angiogenesis-related disorders.

The terms "cell proliferative disorder" and "proliferative disorder" refer to disorders that are associated with some degree of abnormal cell proliferation. In one embodiment, the cell proliferative disorder is cancer.

"Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues. The terms "cancer", "cancerous", "cell proliferative disorder", "proliferative disorder" and "tumor" are not mutually exclusive as referred to herein.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth/proliferation. Examples of cancer include but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung, squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancer.

65

Dysregulation of angiogenesis can lead to many disorders that can be treated by compositions and methods of the invention. These disorders include both non-neoplastic and neoplastic conditions. Neoplastics include but are not limited those described above. Non-neoplastic disorders include but are not limited to undesired or aberrant hypertrophy, arthritis, rheumatoid arthritis (RA), psoriasis, psoriatic plaques, sarcoidosis, atherosclerosis, atherosclerotic plaques, diabetic and other proliferative retinopathies including retinopathy of prematurity, retrolental fibroplasia, neovascular glaucoma, age-related macular degeneration, diabetic macular edema, corneal neovascularization, corneal graft neovascularization, corneal graft rejection, retinal/choroidal neovascularization, neovascularization of the angle (rubeosis), ocular neovascular disease, vascular restenosis, arteriovenous malformations (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, thyroid hyperplasias (including Grave's disease), corneal and other tissue transplantation, chronic inflammation, lung inflammation, acute lung injury/ARDS, sepsis, primary pulmonary hypertension, malignant pulmonary effusions, cerebral edema (e.g., associated with acute stroke/ closed head injury/ trauma), synovial inflammation, pannus formation in RA, myositis ossificans, hypertrophic bone formation, osteoarthritis (OA), refractory ascites, polycystic ovarian disease, endometriosis, 3rd spacing of fluid diseases (pancreatitis, compartment syndrome, burns, bowel disease), uterine fibroids, premature labor, chronic inflammation such as IBD (Crohn's disease and ulcerative colitis), renal allograft rejection, inflammatory bowel disease, nephrotic syndrome, undesired or aberrant tissue mass growth (non-cancer), hemophilic joints, hypertrophic scars, inhibition of hair growth, Osler-Weber syndrome, pyogenic granuloma retrolental fibroplasias, scleroderma, trachoma, vascular adhesions, synovitis, dermatitis, preeclampsia, ascites, pericardial effusion (such as that associated with pericarditis), and pleural effusion.

As used herein, "treatment" refers to clinical intervention in an attempt to alter the natural course of the individual or cell being treated, and can be performed either for prophylaxis or during the course of clinical pathology. Desirable effects of treatment include preventing occurrence or recurrence of disease, alleviation of symptoms, diminishment of any direct or indirect pathological consequences of the disease, preventing metastasis, decreasing the rate of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission or improved prognosis. In some embodiments, antibodies of the invention are used to delay development of a disease or disorder.

An "effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic or prophylactic result.

A "therapeutically effective amount" of a substance/molecule of the invention, agonist or antagonist may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the substance/molecule, agonist or antagonist to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the substance/molecule, agonist or antagonist are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages

66

and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically but not necessarily, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount will be less than the therapeutically effective amount.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (e.g., At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents e.g. methotrexate, adriamycin, vinca alkaloids (vincristine, vinblastine, etoposide), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents, enzymes and fragments thereof such as nucleolytic enzymes, antibiotics, and toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof, and the various antitumor or anticancer agents disclosed below. Other cytotoxic agents are described below. A tumoricidal agent causes destruction of tumor cells.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer.

Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and CYTOXAN® cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachone; lapachol; colchicines; betulinic acid; a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scoplectin, and 9-aminocamptothecin); bryostatin; callystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); podophyllotoxin; podophyllinic acid; teniposide; cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, and ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e. g., calicheamicin, especially calicheamicin gammaII and calicheamicin omegaII (see, e.g., Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dynemicin, including dynemicin A; an esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antiobiotic chromophores), aclacinomysina, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carabacin, carminomycin, carzinophilin, chromomycinis, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, ADRIAMYCIN® doxorubicin (including morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin and deoxydoxorubicin), epirubicin,

67

esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, 5
pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitio stanol, mepitio stanol, testolactone; anti- adrenals such as aminogluthethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; 10
aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; eniluracil; ansacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK® polysaccharide complex (JHS
15 Natural Products, Eugene, OR); razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); thiotepa; taxoids, e.g., TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ Cremiophor-
20 free, albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), and TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); chloranbucil; gemcitabine (GEMZAR®); 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine (VELBAN®); platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristine (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovovin; vinorelbine
25 (NAVELBINE®); novantrone; edatrexate; dannomycin; aminopterin; ibandronate; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid; capecitabine (XELODA®); pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above such as CHOP, an abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone, and FOLFOX, an abbreviation for a
30 treatment regimen with oxaliplatin (ELOXATIN™) combined with 5-FU and leucovovin.

Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate, reduce, block, or inhibit the effects of hormones that can promote the growth of cancer, and are often in the form of systemic, or whole-body treatment. They may be hormones themselves. Examples include anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen
35 (including NOLVADEX® tamoxifen), EVISTA® raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and FARESTON® toremifene; anti-progesterones; estrogen receptor down-regulators (ERDs); agents that function to suppress or shut down the ovaries,

62

for example, leutinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists such as LUPRON® and ELIGARD® leuprolide acetate, goserelin acetate, buserelin acetate and triptorelin; other anti-androgens such as flutamide, nilutamide and bicalutamide; and aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, MEGASE® megestrol acetate, AROMASIN® exemestane, formestane, fadrozole, RIVISOR® vorozole, FEMARA® letrozole, and ARIMIDEX® anastrozole. In addition, such definition of chemotherapeutic agents includes bisphosphonates such as clodronate (for example, BONEFOS® or OSTAC®), DIDROCAL® etidronate, NE-58095, ZOMETA® zoledronic acid/zoledronate, FOSAMAX® alendronate, AREDIA® pamidronate, SKELID® tiludronate, or ACTONEL® risedronate; as well as troxacitabine (a 1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those that inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in aberrant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf, H-Ras, and epidermal growth factor receptor (EGF-R); vaccines such as THERATOPE® vaccine and gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID vaccine; LURTOTECAN® topoisomerase 1 inhibitor; ABARELIX® mRH; lapatinib ditosylate (an ErbB-2 and EGFR dual tyrosine kinase small-molecule inhibitor also known as GW572016); and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell whose growth is dependent upon HGF/c-met activation either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of HGF/c-met-dependent cells in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxanes, and topoisomerase II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13. The taxanes (paclitaxel and docetaxel) are anticancer drugs both derived from the yew tree. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derived from the European yew, is a semisynthetic analogue of paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel and docetaxel promote the assembly of microtubules from tubulin dimers and stabilize microtubules by preventing depolymerization, which results in the inhibition of mitosis in cells.

"Doxorubicin" is an anthracycline antibiotic. The full chemical name of doxorubicin is (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione.

Generating variant antibodies exhibiting reduced or absence of HAMA response

Reduction or elimination of a HAMA response is a significant aspect of clinical development of suitable therapeutic agents. See, e.g., Khazzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988; Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495. As described herein, the invention provides antibodies that are humanized such that HAMA response is reduced or eliminated. Variants of these antibodies can further be obtained using routine methods known in the art, some of which are further described below.

For example, an amino acid sequence from an antibody as described herein can serve as a starting (parent) sequence for diversification of the framework and/or hypervariable sequence(s). A selected framework sequence to which a starting hypervariable sequence is linked is referred to herein as an acceptor human framework. While the acceptor human frameworks may be from, or derived from, a human immunoglobulin (the VL and/or VH regions thereof), preferably the acceptor human frameworks are from, or derived from, a human consensus framework sequence as such frameworks have been demonstrated to have minimal, or no, immunogenicity in human patients.

Where the acceptor is derived from a human immunoglobulin, one may optionally select a human framework sequence that is selected based on its homology to the donor framework sequence by aligning the donor framework sequence with various human framework sequences in a collection of human framework sequences, and select the most homologous framework sequence as the acceptor.

In one embodiment, human consensus frameworks herein are from, or derived from, VH subgroup III and/or VL kappa subgroup I consensus framework sequences.

Thus, the VH acceptor human framework may comprise one, two, three or all of the following framework sequences:

FR1 comprising EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42),

FR2 comprising WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:43),

FR3 comprising FR3 comprises RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:50), wherein X1 is A or R, X2 is T or N, and X3 is A or L,

FR4 comprising WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45).

Examples of VH consensus frameworks include:

human VH subgroup I consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:19);

human VH subgroup I consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:20-22);

human VH subgroup II consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:23);

human VH subgroup II consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:24-26);

human VH subgroup III consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:27);
human VH subgroup III consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NO:28-30);

human VH acceptor framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:31);

- 5 human VH acceptor framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:32-33);
human VH acceptor 2 framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:34); or
human VH acceptor 2 framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:35-37).

In one embodiment, the VH acceptor human framework comprises one, two, three or all of the following framework sequences:

- 10 FR1 comprising EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42),
FR2 comprising WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:43),
FR3 comprising RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:51),
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO:52),
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:53),
15 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEQ ID NO:54), or
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEQ ID NO:55)
FR4 comprising WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45).

The VL acceptor human framework may comprise one, two, three or all of the following framework sequences:

- 20 FR1 comprising DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC (SEQ ID NO:46),
FR2 comprising WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:47),
FR3 comprising GVPSTRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:48),
FR4 comprising FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:49).

Examples of VL consensus frameworks include:

- 25 human VL kappa subgroup I consensus framework (SEQ ID NO:38);
human VL kappa subgroup II consensus framework (SEQ ID NO:39);
human VL kappa subgroup III consensus framework (SEQ ID NO:40); or
human VL kappa subgroup IV consensus framework (SEQ ID NO:41)

30 While the acceptor may be identical in sequence to the human framework sequence selected, whether that be from a human immunoglobulin or a human consensus framework, the present invention contemplates that the acceptor sequence may comprise pre-existing amino acid substitutions relative to the human immunoglobulin sequence or human consensus framework sequence. These pre-existing substitutions are preferably minimal; usually four, three, two or one amino acid differences only relative to the human immunoglobulin sequence or consensus framework sequence.

35 Hypervariable region residues of the non-human antibody are incorporated into the VL and/or VH acceptor human frameworks. For example, one may incorporate residues corresponding to the Kabat CDR residues, the Chothia hypervariable loop residues, the Abm residues, and/or contact

residues. Optionally, the extended hypervariable region residues as follows are incorporated: 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 or 49-65 (H2) and 93-102, 94-102, or 95-102 (H3).

While "incorporation" of hypervariable region residues is discussed herein, it will be appreciated that this can be achieved in various ways, for example, nucleic acid encoding the desired amino acid sequence can be generated by mutating nucleic acid encoding the mouse variable domain sequence so that the framework residues thereof are changed to acceptor human framework residues, or by mutating nucleic acid encoding the human variable domain sequence so that the hypervariable domain residues are changed to non-human residues, or by synthesizing nucleic acid encoding the desired sequence, etc.

In the examples herein, hypervariable region-grafted variants were generated by Kunkel mutagenesis of nucleic acid encoding the human acceptor sequences, using a separate oligonucleotide for each hypervariable region. Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Appropriate changes can be introduced within the framework and/or hypervariable region, using routine techniques, to correct and re-establish proper hypervariable region-antigen interactions.

Phage(mid) display (also referred to herein as phage display in some contexts) can be used as a convenient and fast method for generating and screening many different potential variant antibodies in a library generated by sequence randomization. However, other methods for making and screening altered antibodies are available to the skilled person.

Phage(mid) display technology has provided a powerful tool for generating and selecting novel proteins which bind to a ligand, such as an antigen. Using the techniques of phage(mid) display allows the generation of large libraries of protein variants which can be rapidly sorted for those sequences that bind to a target molecule with high affinity. Nucleic acids encoding variant polypeptides are generally fused to a nucleic acid sequence encoding a viral coat protein, such as the gene III protein or the gene VIII protein. Monovalent phagemid display systems where the nucleic acid sequence encoding the protein or polypeptide is fused to a nucleic acid sequence encoding a portion of the gene III protein have been developed. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). In a monovalent phagemid display system, the gene fusion is expressed at low levels and wild type gene III proteins are also expressed so that infectivity of the particles is retained. Methods of generating peptide libraries and screening those libraries have been disclosed in many patents (e.g. U.S. Patent No. 5,723,286, U.S. Patent No. 5,432, 018, U.S. Patent No. 5,580,717, U.S. Patent No. 5,427,908 and U.S. Patent No. 5,498,530).

Libraries of antibodies or antigen binding polypeptides have been prepared in a number of ways including by altering a single gene by inserting random DNA sequences or by cloning a family of related genes. Methods for displaying antibodies or antigen binding fragments using phage(mid) display have been described in U.S. Patent Nos. 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108,

6,172,197, 5,580,717, and 5,658,727. The library is then screened for expression of antibodies or antigen binding proteins with the desired characteristics.

Methods of substituting an amino acid of choice into a template nucleic acid are well established in the art, some of which are described herein. For example, hypervariable region residues can be substituted using the Kunkel method. See, *e.g.*, Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

The sequence of oligonucleotides includes one or more of the designed codon sets for the hypervariable region residues to be altered. A codon set is a set of different nucleotide triplet sequences used to encode desired variant amino acids. Codon sets can be represented using symbols to designate particular nucleotides or equimolar mixtures of nucleotides as shown in below according to the IUB code.

IUB CODES

G Guanine

A Adenine

T Thymine

C Cytosine

R (A or G)

Y (C or T)

M (A or C)

K (G or T)

S (C or G)

W (A or T)

H (A or C or T)

B (C or G or T)

V (A or C or G)

D (A or G or T) H

N (A or C or G or T)

For example, in the codon set DVK, D can be nucleotides A or G or T; V can be A or G or C; and K can be G or T. This codon set can present 18 different codons and can encode amino acids Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Gln, Gly, and Cys.

Oligonucleotide or primer sets can be synthesized using standard methods. A set of oligonucleotides can be synthesized, for example, by solid phase synthesis, containing sequences that represent all possible combinations of nucleotide triplets provided by the codon set and that will encode the desired group of amino acids. Synthesis of oligonucleotides with selected nucleotide "degeneracy" at certain positions is well known in that art. Such sets of nucleotides having certain codon sets can be synthesized using commercial nucleic acid synthesizers (available from, for example, Applied Biosystems, Foster City, CA), or can be obtained commercially (for example, from

Life Technologies, Rockville, MD). Therefore, a set of oligonucleotides synthesized having a particular codon set will typically include a plurality of oligonucleotides with different sequences, the differences established by the codon set within the overall sequence. Oligonucleotides, as used according to the invention, have sequences that allow for hybridization to a variable domain nucleic acid template and also can include restriction enzyme sites for cloning purposes.

In one method, nucleic acid sequences encoding variant amino acids can be created by oligonucleotide-mediated mutagenesis. This technique is well known in the art as described by Zoller *et al. Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987). Briefly, nucleic acid sequences encoding variant amino acids are created by hybridizing an oligonucleotide set encoding the desired codon sets to a DNA template, where the template is the single-stranded form of the plasmid containing a variable region nucleic acid template sequence. After hybridization, DNA polymerase is used to synthesize an entire second complementary strand of the template that will thus incorporate the oligonucleotide primer, and will contain the codon sets as provided by the oligonucleotide set.

Generally, oligonucleotides of at least 25 nucleotides in length are used. An optimal oligonucleotide will have 12 to 15 nucleotides that are completely complementary to the template on either side of the nucleotide(s) coding for the mutation(s). This ensures that the oligonucleotide will hybridize properly to the single-stranded DNA template molecule. The oligonucleotides are readily synthesized using techniques known in the art such as that described by Crea *et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

The DNA template is generated by those vectors that are either derived from bacteriophage M13 vectors (the commercially available M13mp18 and M13mp19 vectors are suitable), or those vectors that contain a single-stranded phage origin of replication as described by Viera *et al., Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Thus, the DNA that is to be mutated can be inserted into one of these vectors in order to generate single-stranded template. Production of the single-stranded template is described in sections 4.21-4.41 of Sambrook *et al.*, above.

To alter the native DNA sequence, the oligonucleotide is hybridized to the single stranded template under suitable hybridization conditions. A DNA polymerizing enzyme, usually T7 DNA polymerase or the Klenow fragment of DNA polymerase I, is then added to synthesize the complementary strand of the template using the oligonucleotide as a primer for synthesis. A heteroduplex molecule is thus formed such that one strand of DNA encodes the mutated form of gene 1, and the other strand (the original template) encodes the native, unaltered sequence of gene 1. This heteroduplex molecule is then transformed into a suitable host cell, usually a prokaryote such as *E. coli* JM101. After growing the cells, they are plated onto agarose plates and screened using the oligonucleotide primer radiolabelled with a 32-Phosphate to identify the bacterial colonies that contain the mutated DNA.

The method described immediately above may be modified such that a homoduplex molecule is created wherein both strands of the plasmid contain the mutation(s). The modifications are as

74

follows: The single stranded oligonucleotide is annealed to the single-stranded template as described above. A mixture of three deoxyribonucleotides, deoxyriboadenosine (dATP), deoxyriboguanosine (dGTP), and deoxyribothymidine (dTTP), is combined with a modified thiodeoxyribocytosine called dCTP-(aS) (which can be obtained from Amersham). This mixture is added to the template-oligonucleotide complex. Upon addition of DNA polymerase to this mixture, a strand of DNA identical to the template except for the mutated bases is generated. In addition, this new strand of DNA will contain dCTP-(aS) instead of dCTP, which serves to protect it from restriction endonuclease digestion. After the template strand of the double-stranded heteroduplex is nicked with an appropriate restriction enzyme, the template strand can be digested with ExoIII nuclease or another appropriate nuclease past the region that contains the site(s) to be mutagenized. The reaction is then stopped to leave a molecule that is only partially single-stranded. A complete double-stranded DNA homoduplex is then formed using DNA polymerase in the presence of all four deoxyribonucleotide triphosphates, ATP, and DNA ligase. This homoduplex molecule can then be transformed into a suitable host cell.

As indicated previously the sequence of the oligonucleotide set is of sufficient length to hybridize to the template nucleic acid and may also, but does not necessarily, contain restriction sites. The DNA template can be generated by those vectors that are either derived from bacteriophage M13 vectors or vectors that contain a single-stranded phage origin of replication as described by Viera *et al. Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Thus, the DNA that is to be mutated must be inserted into one of these vectors in order to generate single-stranded template. Production of the single-stranded template is described in sections 4.21-4.41 of Sambrook *et al., supra*.

According to another method, a library can be generated by providing upstream and downstream oligonucleotide sets, each set having a plurality of oligonucleotides with different sequences, the different sequences established by the codon sets provided within the sequence of the oligonucleotides. The upstream and downstream oligonucleotide sets, along with a variable domain template nucleic acid sequence, can be used in a polymerase chain reaction to generate a "library" of PCR products. The PCR products can be referred to as "nucleic acid cassettes", as they can be fused with other related or unrelated nucleic acid sequences, for example, viral coat proteins and dimerization domains, using established molecular biology techniques.

The sequence of the PCR primers includes one or more of the designed codon sets for the solvent accessible and highly diverse positions in a hypervariable region. As described above, a codon set is a set of different nucleotide triplet sequences used to encode desired variant amino acids.

Antibody selectants that meet the desired criteria, as selected through appropriate screening/selection steps can be isolated and cloned using standard recombinant techniques.

Vectors, Host Cells and Recombinant Methods

For recombinant production of an antibody of the invention, the nucleic acid encoding it is isolated and inserted into a replicable vector for further cloning (amplification of the DNA) or for

expression. DNA encoding the antibody is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the antibody). Many vectors are available. The choice of vector depends in part on the host cell to be used. Generally, preferred host cells are of either prokaryotic or eukaryotic (generally mammalian) origin.

Generating antibodies using prokaryotic host cells:

Vector Construction

Polynucleotide sequences encoding polypeptide components of the antibody of the invention can be obtained using standard recombinant techniques. Desired polynucleotide sequences may be isolated and sequenced from antibody producing cells such as hybridoma cells. Alternatively, polynucleotides can be synthesized using nucleotide synthesizer or PCR techniques. Once obtained, sequences encoding the polypeptides are inserted into a recombinant vector capable of replicating and expressing heterologous polynucleotides in prokaryotic hosts. Many vectors that are available and known in the art can be used for the purpose of the present invention. Selection of an appropriate vector will depend mainly on the size of the nucleic acids to be inserted into the vector and the particular host cell to be transformed with the vector. Each vector contains various components, depending on its function (amplification or expression of heterologous polynucleotide, or both) and its compatibility with the particular host cell in which it resides. The vector components generally include, but are not limited to: an origin of replication, a selection marker gene, a promoter, a ribosome binding site (RBS), a signal sequence, the heterologous nucleic acid insert and a transcription termination sequence.

In general, plasmid vectors containing replicon and control sequences which are derived from species compatible with the host cell are used in connection with these hosts. The vector ordinarily carries a replication site, as well as marking sequences which are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. For example, *E. coli* is typically transformed using pBR322, a plasmid derived from an *E. coli* species. pBR322 contains genes encoding ampicillin (Amp) and tetracycline (Tet) resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells. pBR322, its derivatives, or other microbial plasmids or bacteriophage may also contain, or be modified to contain, promoters which can be used by the microbial organism for expression of endogenous proteins. Examples of pBR322 derivatives used for expression of particular antibodies are described in detail in Carter et al., U.S. Patent No. 5,648,237.

In addition, phage vectors containing replicon and control sequences that are compatible with the host microorganism can be used as transforming vectors in connection with these hosts. For example, bacteriophage such as λ GEM.TM.-11 may be utilized in making a recombinant vector which can be used to transform susceptible host cells such as *E. coli* LE392.

The expression vector of the invention may comprise two or more promoter-cistron pairs, encoding each of the polypeptide components. A promoter is an untranslated regulatory sequence

7b

located upstream (5') to a cistron that modulates its expression. Prokaryotic promoters typically fall into two classes, inducible and constitutive. Inducible promoter is a promoter that initiates increased levels of transcription of the cistron under its control in response to changes in the culture condition, e.g. the presence or absence of a nutrient or a change in temperature.

5 A large number of promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. The selected promoter can be operably linked to cistron DNA encoding the light or heavy chain by removing the promoter from the source DNA via restriction enzyme digestion and inserting the isolated promoter sequence into the vector of the invention. Both the native promoter sequence and many heterologous promoters may be used to direct amplification and/or expression of the target
10 genes. In some embodiments, heterologous promoters are utilized, as they generally permit greater transcription and higher yields of expressed target gene as compared to the native target polypeptide promoter.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the *PhoA* promoter, the β -galactamase and lactose promoter systems, a tryptophan (*trp*) promoter system and hybrid promoters
15 such as the *tac* or the *trc* promoter. However, other promoters that are functional in bacteria (such as other known bacterial or phage promoters) are suitable as well. Their nucleotide sequences have been published, thereby enabling a skilled worker operably to ligate them to cistrons encoding the target light and heavy chains (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) using linkers or adaptors to supply any required restriction sites.

20 In one aspect of the invention, each cistron within the recombinant vector comprises a secretion signal sequence component that directs translocation of the expressed polypeptides across a membrane. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the target polypeptide DNA that is inserted into the vector. The signal sequence selected for the purpose of this invention should be one that is recognized and processed (i.e. cleaved by a signal
25 peptidase) by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the signal sequences native to the heterologous polypeptides, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group consisting of the alkaline phosphatase, penicillinase, Ipp, or heat-stable enterotoxin II (STII) leaders, LamB, PhoE, PelB, OmpA and MBP. In one embodiment of the invention, the signal sequences used in both cistrons of the expression
30 system are STII signal sequences or variants thereof.

In another aspect, the production of the immunoglobulins according to the invention can occur in the cytoplasm of the host cell, and therefore does not require the presence of secretion signal sequences within each cistron. In that regard, immunoglobulin light and heavy chains are expressed,
35 folded and assembled to form functional immunoglobulins within the cytoplasm. Certain host strains (e.g., the *E. coli* *trxB* strains) provide cytoplasm conditions that are favorable for disulfide bond formation, thereby permitting proper folding and assembly of expressed protein subunits. Proba and Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

27

The present invention provides an expression system in which the quantitative ratio of expressed polypeptide components can be modulated in order to maximize the yield of secreted and properly assembled antibodies of the invention. Such modulation is accomplished at least in part by simultaneously modulating translational strengths for the polypeptide components.

5 One technique for modulating translational strength is disclosed in Simmons et al., U.S. Pat. No. 5,840,523. It utilizes variants of the translational initiation region (TIR) within a cistron. For a given TIR, a series of amino acid or nucleic acid sequence variants can be created with a range of translational strengths, thereby providing a convenient means by which to adjust this factor for the desired expression level of the specific chain. TIR variants can be generated by conventional
10 mutagenesis techniques that result in codon changes which can alter the amino acid sequence, although silent changes in the nucleotide sequence are preferred. Alterations in the TIR can include, for example, alterations in the number or spacing of Shine-Dalgarno sequences, along with alterations in the signal sequence. One method for generating mutant signal sequences is the generation of a "codon bank" at the beginning of a coding sequence that does not change the amino acid sequence of the signal sequence (i.e., the changes are silent). This can be accomplished by changing the third
15 nucleotide position of each codon; additionally, some amino acids, such as leucine, serine, and arginine, have multiple first and second positions that can add complexity in making the bank. This method of mutagenesis is described in detail in Yansura et al. (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

20 Preferably, a set of vectors is generated with a range of TIR strengths for each cistron therein. This limited set provides a comparison of expression levels of each chain as well as the yield of the desired antibody products under various TIR strength combinations. TIR strengths can be determined by quantifying the expression level of a reporter gene as described in detail in Simmons et al. U.S. Pat. No. 5, 840,523. Based on the translational strength comparison, the desired individual TIRs are
25 selected to be combined in the expression vector constructs of the invention.

Prokaryotic host cells suitable for expressing antibodies of the invention include *Archaeobacteria* and *Bubacteria*, such as Gram-negative or Gram-positive organisms. Examples of useful bacteria include *Escherichia* (e.g., *E. coli*), *Bacilli* (e.g., *B. subtilis*), *Enterobacteria*, *Pseudomonas* species (e.g., *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*,
30 *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, or *Paracoccus*. In one embodiment, gram-negative cells are used. In one embodiment, *E. coli* cells are used as hosts for the invention. Examples of *E. coli* strains include strain W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325) and derivatives thereof, including strain 33D3 having genotype W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac Iq lacL8*
35 $\Delta ompTA(nmpc-fepE)$ *degP41 kan^R* (U.S. Pat. No. 5,639,635). Other strains and derivatives thereof, such as *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) and *E. coli* RV308(ATCC 31,608) are also suitable. These examples are illustrative rather than limiting.

78

Methods for constructing derivatives of any of the above-mentioned bacteria having defined genotypes are known in the art and described in, for example, Bass *et al.*, Proteins, 8:309-314 (1990). It is generally necessary to select the appropriate bacteria taking into consideration replicability of the replicon in the cells of a bacterium. For example, *E. coli*, *Serratia*, or *Salmonella* species can be suitably used as the host when well known plasmids such as pBR322, pBR325, pACYC177, or pKN410 are used to supply the replicon. Typically the host cell should secrete minimal amounts of proteolytic enzymes, and additional protease inhibitors may desirably be incorporated in the cell culture.

Antibody Production

Host cells are transformed with the above-described expression vectors and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

Transformation means introducing DNA into the prokaryotic host so that the DNA is replicable, either as an extrachromosomal element or by chromosomal integrant. Depending on the host cell used, transformation is done using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride is generally used for bacterial cells that contain substantial cell-wall barriers. Another method for transformation employs polyethylene glycol/DMSO. Yet another technique used is electroporation.

Prokaryotic cells used to produce the polypeptides of the invention are grown in media known in the art and suitable for culture of the selected host cells. Examples of suitable media include luria broth (LB) plus necessary nutrient supplements. In some embodiments, the media also contains a selection agent, chosen based on the construction of the expression vector, to selectively permit growth of prokaryotic cells containing the expression vector. For example, ampicillin is added to media for growth of cells expressing ampicillin resistant gene.

Any necessary supplements besides carbon, nitrogen, and inorganic phosphate sources may also be included at appropriate concentrations introduced alone or as a mixture with another supplement or medium such as a complex nitrogen source. Optionally the culture medium may contain one or more reducing agents selected from the group consisting of glutathione, cysteine, cystamine, thioglycollate, dithioerythritol and dithiothreitol.

The prokaryotic host cells are cultured at suitable temperatures. For *E. coli* growth, for example, the preferred temperature ranges from about 20°C to about 39°C, more preferably from about 25°C to about 37°C, even more preferably at about 30°C. The pH of the medium may be any pH ranging from about 5 to about 9, depending mainly on the host organism. For *E. coli*, the pH is preferably from about 6.8 to about 7.4, and more preferably about 7.0.

If an inducible promoter is used in the expression vector of the invention, protein expression is induced under conditions suitable for the activation of the promoter. In one aspect of the invention, *PhoA* promoters are used for controlling transcription of the polypeptides. Accordingly, the

transformed host cells are cultured in a phosphate-limiting medium for induction. Preferably, the phosphate-limiting medium is the C.R.A.P medium (see, e.g., Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). A variety of other inducers may be used, according to the vector construct employed, as is known in the art.

5 In one embodiment, the expressed polypeptides of the present invention are secreted into and recovered from the periplasm of the host cells. Protein recovery typically involves disrupting the microorganism, generally by such means as osmotic shock, sonication or lysis. Once cells are disrupted, cell debris or whole cells may be removed by centrifugation or filtration. The proteins may be further purified, for example, by affinity resin chromatography. Alternatively, proteins can be
10 transported into the culture media and isolated therein. Cells may be removed from the culture and the culture supernatant being filtered and concentrated for further purification of the proteins produced. The expressed polypeptides can be further isolated and identified using commonly known methods such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western blot assay.

15 In one aspect of the invention, antibody production is conducted in large quantity by a fermentation process. Various large-scale fed-batch fermentation procedures are available for production of recombinant proteins. Large-scale fermentations have at least 1000 liters of capacity, preferably about 1,000 to 100,000 liters of capacity. These fermentors use agitator impellers to distribute oxygen and nutrients, especially glucose (the preferred carbon/energy source). Small scale fermentation refers generally to fermentation in a fermentor that is no more than approximately 100
20 liters in volumetric capacity, and can range from about 1 liter to about 100 liters.

In a fermentation process, induction of protein expression is typically initiated after the cells have been grown under suitable conditions to a desired density, e.g., an OD₅₅₀ of about 180-220, at which stage the cells are in the early stationary phase. A variety of inducers may be used, according to the vector construct employed, as is known in the art and described above. Cells may be grown for
25 shorter periods prior to induction. Cells are usually induced for about 12-50 hours, although longer or shorter induction time may be used.

To improve the production yield and quality of the polypeptides of the invention, various fermentation conditions can be modified. For example, to improve the proper assembly and folding of the secreted antibody polypeptides, additional vectors overexpressing chaperone proteins, such as
30 Dsb proteins (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD and or DsbG) or FkpA (a peptidylprolyl cis,trans-isomerase with chaperone activity) can be used to co-transform the host prokaryotic cells. The chaperone proteins have been demonstrated to facilitate the proper folding and solubility of heterologous proteins produced in bacterial host cells. Chen et al. (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou et al., U.S. Patent No. 6,083,715; Georgiou et al., U.S. Patent No. 6,027,888; Bothmann and
35 Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

To minimize proteolysis of expressed heterologous proteins (especially those that are

proteolytically sensitive), certain host strains deficient for proteolytic enzymes can be used for the present invention. For example, host cell strains may be modified to effect genetic mutation(s) in the genes encoding known bacterial proteases such as Protease III, OmpT, DegP, Tsp, Protease I, Protease Mi, Protease V, Protease VI and combinations thereof. Some *E. coli* protease-deficient strains are available and described in, for example, Joly et al. (1998), *supra*; Georgiou et al., U.S. Patent No. 5,264,365; Georgiou et al., U.S. Patent No. 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

In one embodiment, *E. coli* strains deficient for proteolytic enzymes and transformed with plasmids overexpressing one or more chaperone proteins are used as host cells in the expression system of the invention.

Antibody Purification

In one embodiment, the antibody protein produced herein is further purified to obtain preparations that are substantially homogeneous for further assays and uses. Standard protein purification methods known in the art can be employed. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: fractionation on immunoaffinity or ion-exchange columns, ethanol precipitation, reverse phase HPLC, chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE, chromatofocusing, SDS-PAGE, ammonium sulfate precipitation, and gel filtration using, for example, Sephadex G-75.

In one aspect, Protein A immobilized on a solid phase is used for immunoaffinity purification of the full length antibody products of the invention. Protein A is a 41kD cell wall protein from *Staphylococcus aureus* which binds with a high affinity to the Fc region of antibodies. Lindmark et al (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. The solid phase to which Protein A is immobilized is preferably a column comprising a glass or silica surface, more preferably a controlled pore glass column or a silicic acid column. In some applications, the column has been coated with a reagent, such as glycerol, in an attempt to prevent nonspecific adherence of contaminants.

As the first step of purification, the preparation derived from the cell culture as described above is applied onto the Protein A immobilized solid phase to allow specific binding of the antibody of interest to Protein A. The solid phase is then washed to remove contaminants non-specifically bound to the solid phase. Finally the antibody of interest is recovered from the solid phase by elution.

Generating antibodies using eukaryotic host cells:

The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence.

(i) Signal sequence component

A vector for use in a eukaryotic host cell may also contain a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide of interest. The heterologous signal sequence selected preferably is one that is recognized and processed

(i.e., cleaved by a signal peptidase) by the host cell. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences as well as viral secretory leaders, for example, the herpes simplex gD signal, are available.

The DNA for such precursor region is ligated in reading frame to DNA encoding the antibody.

5 (ii) *Origin of replication*

Generally, an origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors. For example, the SV40 origin may typically be used only because it contains the early promoter.

10 (iii) *Selection gene component*

Expression and cloning vectors may contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, where relevant, or (c) supply critical nutrients not available from complex media.

One example of a selection scheme utilizes a drug to arrest growth of a host cell. Those cells that are successfully transformed with a heterologous gene produce a protein conferring drug resistance and thus survive the selection regimen. Examples of such dominant selection use the drugs neomycin, mycophenolic acid and hygromycin.

Another example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the antibody nucleic acid, such as DHFR, thymidine kinase, metallothionein-I and -II, preferably primate metallothionein genes, adenosine deaminase, ornithine decarboxylase, etc.

For example, cells transformed with the DHFR selection gene are first identified by culturing all of the transformants in a culture medium that contains methotrexate (Mtx), a competitive antagonist of DHFR. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the Chinese hamster ovary (CHO) cell line deficient in DHFR activity (e.g., ATCC CRL-9096).

Alternatively, host cells (particularly wild-type hosts that contain endogenous DHFR) transformed or co-transformed with DNA sequences encoding an antibody, wild-type DHFR protein, and another selectable marker such as aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) can be selected by cell growth in medium containing a selection agent for the selectable marker such as an aminoglycosidic antibiotic, e.g., kanamycin, neomycin, or G418. See U.S. Patent No. 4,965,199.

30 (iv) *Promoter component*

Expression and cloning vectors usually contain a promoter that is recognized by the host organism and is operably linked to the antibody polypeptide nucleic acid. Promoter sequences are known for eukaryotes. Virtually alleukaryotic genes have an AT-rich region located approximately 25 to 30 bases upstream from the site where transcription is initiated. Another sequence found 70 to 80 bases upstream from the start of transcription of many genes is a CNCAAT region where N may be any nucleotide. At the 3' end of most eukaryotic genes is an AATAAA sequence that may be the

signal for addition of the poly A tail to the 3' end of the coding sequence. All of these sequences are suitably inserted into eukaryotic expression vectors.

Antibody polypeptide transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, *e.g.*, the actin promoter or an immunoglobulin promoter, from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

The early and late promoters of the SV40 virus are conveniently obtained as an SV40 restriction fragment that also contains the SV40 viral origin of replication. The immediate early promoter of the human cytomegalovirus is conveniently obtained as a HindIII E restriction fragment. A system for expressing DNA in mammalian hosts using the bovine papilloma virus as a vector is disclosed in U.S. Patent No. 4,419,446. A modification of this system is described in U.S. Patent No. 4,601,978. See also Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) on expression of human β -interferon cDNA in mouse cells under the control of a thymidine kinase promoter from herpes simplex virus. Alternatively, the Rous Sarcoma Virus long terminal repeat can be used as the promoter.

(v) Enhancer element component

Transcription of DNA encoding the antibody polypeptide of this invention by higher eukaryotes is often increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. See also Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) on enhancing elements for activation of eukaryotic promoters. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the antibody polypeptide-encoding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

(vi) Transcription termination component

Expression vectors used in eukaryotic host cells will typically also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding an antibody. One useful transcription termination component is the bovine growth hormone polyadenylation region. See WO94/11026 and the expression vector disclosed therein.

(vii) Selection and transformation of host cells

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include higher eukaryote cells described herein, including vertebrate host cells. Propagation of vertebrate cells in

culture (tissue culture) has become a routine procedure. Examples of useful mammalian host cell lines are monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.*, *J. Gen Virol* 36:59 (1977)) ; baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)) ; mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)) ; monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI cells (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma line (Hep G2).

Host cells are transformed with the above-described expression or cloning vectors for antibody production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

(viii) Culturing the host cells

The host cells used to produce an antibody of this invention may be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; or 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; or U.S. Patent Re. 30,985 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GENTAMYCIN™ drug), trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

(ix) Purification of antibody

When using recombinant techniques, the antibody can be produced intracellularly, or directly secreted into the medium. If the antibody is produced intracellularly, as a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments, are removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Where the antibody is secreted into the medium, supernatants from such expression systems are generally first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. A protease inhibitor such as PMSF

may be included in any of the foregoing steps to inhibit proteolysis and antibiotics may be included to prevent the growth of adventitious contaminants.

The antibody composition prepared from the cells can be purified using, for example, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, and affinity chromatography, with affinity chromatography being the preferred purification technique. The suitability of protein A as an affinity ligand depends on the species and isotype of any immunoglobulin Fc domain that is present in the antibody. Protein A can be used to purify antibodies that are based on human $\gamma 1$, $\gamma 2$, or $\gamma 4$ heavy chains (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human $\gamma 3$ (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). The matrix to which the affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices such as controlled pore glass or poly(styrenedivinyl)benzene allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody comprises a C_{H3} domain, the Bakerbond ABX™ resin (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) is useful for purification. Other techniques for protein purification such as fractionation on an ion-exchange column, ethanol precipitation, Reverse Phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on heparin SEPHAROSE™ chromatography on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE, and ammonium sulfate precipitation are also available depending on the antibody to be recovered.

Following any preliminary purification step(s), the mixture comprising the antibody of interest and contaminants may be subjected to low pH hydrophobic interaction chromatography using an elution buffer at a pH between about 2.5-4.5, preferably performed at low salt concentrations (*e.g.*, from about 0-0.25M salt).

Activity Assays

The antibodies of the present invention can be characterized for their physical/chemical properties and biological functions by various assays known in the art.

The purified immunoglobulins can be further characterized by a series of assays including, but not limited to, N-terminal sequencing, amino acid analysis, non-denaturing size exclusion high pressure liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry, ion exchange chromatography and papain digestion.

In certain embodiments of the invention, the immunoglobulins produced herein are analyzed for their biological activity. In some embodiments, the immunoglobulins of the present invention are tested for their antigen binding activity. The antigen binding assays that are known in the art and can be used herein include without limitation any direct or competitive binding assays using techniques such as western blots, radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, fluorescent immunoassays, and protein A immunoassays. An illustrative antigen binding assay is provided below in the Examples section.

85

In one embodiment, the present invention contemplates an altered antibody that possesses some but not all effector functions, which make it a desired candidate for many applications in which the half life of the antibody *in vivo* is important yet certain effector functions (such as complement and ADCC) are unnecessary or deleterious. In certain embodiments, the Fc activities of the produced immunoglobulin are measured to ensure that only the desired properties are maintained. In vitro and/or in vivo cytotoxicity assays can be conducted to confirm the reduction/depletion of CDC and/or ADCC activities. For example, Fc receptor (FcR) binding assays can be conducted to ensure that the antibody lacks FcγR binding (hence likely lacking ADCC activity), but retains FcRn binding ability. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII and FcγRIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). An example of an in vitro assay to assess ADCC activity of a molecule of interest is described in US Patent No. 5,500,362 or 5,821,337. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). C1q binding assays may also be carried out to confirm that the antibody is unable to bind C1q and hence lacks CDC activity. To assess complement activation, a CDC assay, e.g. as described in Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed. FcRn binding and in vivo clearance/half life determinations can also be performed using methods known in the art, e.g. those described in the Examples section.

Humanized Antibodies

The present invention encompasses humanized antibodies. Various methods for humanizing non-human antibodies are known in the art. For example, a humanized antibody can have one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), by substituting hypervariable region sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library

of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework for the humanized antibody (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Another method uses a particular framework derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to one method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

Antibody Variants

In one aspect, the invention provides antibody fragment comprising modifications in the interface of Fc polypeptides comprising the Fc region, wherein the modifications facilitate and/or promote heterodimerization. These modifications comprise introduction of a protuberance into a first Fc polypeptide and a cavity into a second Fc polypeptide, wherein the protuberance is positionable in the cavity so as to promote complexing of the first and second Fc polypeptides. Methods of generating antibodies with these modifications are known in the art, *e.g.*, as described in U.S. Pat. No. 5,731,168.

In some embodiments, amino acid sequence modification(s) of the antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of the antibody are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the antibody nucleic acid, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid alterations may be introduced in the subject antibody amino acid sequence at the time that sequence is made.

A useful method for identification of certain residues or regions of the antibody that are

preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Here, a residue or group of target residues are identified (*e.g.*, charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed immunoglobulins are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to a cytotoxic polypeptide. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody to an enzyme (*e.g.* for ADEPT) or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the antibody molecule replaced by a different residue. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 2 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 2, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

TABLE 2

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Gln; 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

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
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; Norleucine	Leu

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Amino acids may be grouped according to similarities in the properties of their side chains (in A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) non-polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) uncharged polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) acidic: Asp (D), Glu (E)
- (4) basic: Lys (K), Arg (R), His(H)

Alternatively, naturally occurring residues may be divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) acidic: Asp, Glu;
- (4) basic: His, Lys, Arg;
- (5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro;
- (6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution

sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

One type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (e.g. a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants involves affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (e.g. 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino acid substitutions at each site. The antibodies thus generated are displayed from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (e.g. binding affinity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and antigen. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the antibody.

It may be desirable to introduce one or more amino acid modifications in an Fc region of the immunoglobulin polypeptides of the invention, thereby generating a Fc region variant. The Fc region variant may comprise a human Fc region sequence (e.g., a human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 Fc region) comprising an amino acid modification (e.g. a substitution) at one or more amino acid positions including that of a hinge cysteine.

In accordance with this description and the teachings of the art, it is contemplated that in some embodiments, an antibody used in methods of the invention may comprise one or more alterations as compared to the wild type counterpart antibody, e.g. in the Fc region. These antibodies would nonetheless retain substantially the same characteristics required for therapeutic utility as compared to their wild type counterpart. For example, it is thought that certain alterations can be made in the Fc region that would result in altered (i.e., either improved or diminished) C1q binding and/or Complement Dependent Cytotoxicity (CDC), e.g., as described in WO99/51642. See also Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); US Patent No. 5,648,260; US Patent No. 5,624,821; and WO94/29351 concerning other examples of Fc region variants.

Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates, or antibody-drug conjugates (ADC), comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, a drug, a growth inhibitory agent, a toxin (*e.g.*, an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

The use of antibody-drug conjugates for the local delivery of cytotoxic or cytostatic agents, *i.e.* drugs to kill or inhibit tumor cells in the treatment of cancer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; U.S. patent 4,975,278) theoretically allows targeted delivery of the drug moiety to tumors, and intracellular accumulation therein, where systemic administration of these unconjugated drug agents may result in unacceptable levels of toxicity to normal cells as well as the tumor cells sought to be eliminated (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). Maximal efficacy with minimal toxicity is sought thereby. Both polyclonal antibodies and monoclonal antibodies have been reported as useful in these strategies (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Drugs used in these methods include daunomycin, doxorubicin, methotrexate, and vindesine (Rowland et al., (1986) *supra*). Toxins used in antibody-toxin conjugates include bacterial toxins such as diphtheria toxin, plant toxins such as ricin, small molecule toxins such as geldanamycin (Mandler et al (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maytansinoids (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), and calicheamicin (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). The toxins may effect their cytotoxic and cytostatic effects by mechanisms including tubulin binding, DNA binding, or topoisomerase inhibition. Some cytotoxic drugs tend to be inactive or less active when conjugated to large antibodies or protein receptor ligands.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idex) is an antibody-radioisotope conjugate composed of a murine IgG1 kappa monoclonal antibody directed against the CD20 antigen found on the surface of normal and malignant B lymphocytes and ¹¹¹In or ⁹⁰Y radioisotope bound by a thiourea linker-chelator (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Although ZEVALIN has activity against B-cell non-Hodgkin's Lymphoma (NHL), administration results in severe and prolonged cytopenias in most patients. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), an antibody drug conjugate composed of a hu CD33 antibody linked to calicheamicin, was approved in 2000 for the treatment of acute myeloid leukemia by injection (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; US Patent Nos. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansine (Immunogen,

Inc.), an antibody drug conjugate composed of the huC242 antibody linked via the disulfide linker SPP to the maytansinoid drug moiety, DM1, is advancing into Phase II trials for the treatment of cancers that express CanAg, such as colon, pancreatic, gastric, and others. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), an antibody drug conjugate composed of the anti-prostate specific membrane antigen (PSMA) monoclonal antibody linked to the maytansinoid drug moiety, DM1, is under development for the potential treatment of prostate tumors. The auristatin peptides, auristatin E (AE) and monomethylauristatin (MMAE), synthetic analogs of dolastatin, were conjugated to chimeric monoclonal antibodies cBR96 (specific to Lewis Y on carcinomas) and cAC10 (specific to CD30 on hematological malignancies) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) and are under therapeutic development.

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomyacin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , and ^{186}Re . Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026.

Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as a calicheamicin, maytansinoids, a tricothecene, and CC1065, and the derivatives of these toxins that have toxin activity, are also contemplated herein.

Maytansine and maytansinoids

In one embodiment, an antibody (full length or fragments) of the invention is conjugated to one or more maytansinoid molecules.

Maytansinoids are mitototic inhibitors which act by inhibiting tubulin polymerization. Maytansine was first isolated from the east African shrub *Maytenus serrata* (U.S. Patent No. 3,896,111). Subsequently, it was discovered that certain microbes also produce maytansinoids, such

as maytansinol and C-3 maytansinol esters (U.S. Patent No. 4,151,042). Synthetic maytansinol and derivatives and analogues thereof are disclosed, for example, in U.S. Patent 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; and 4,371,533, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference.

Maytansinoid-antibody conjugates

In an attempt to improve their therapeutic index, maytansine and maytansinoids have been conjugated to antibodies specifically binding to tumor cell antigens. Immunoconjugates containing maytansinoids and their therapeutic use are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 5,208,020, 5,416,064 and European Patent EP 0 425 235 B1, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) described immunoconjugates comprising a maytansinoid designated DM1 linked to the monoclonal antibody C242 directed against human colorectal cancer. The conjugate was found to be highly cytotoxic towards cultured colon cancer cells, and showed antitumor activity in an *in vivo* tumor growth assay. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describe immunoconjugates in which a maytansinoid was conjugated via a disulfide linker to the murine antibody A7 binding to an antigen on human colon cancer cell lines, or to another murine monoclonal antibody TA.1 that binds the HER-2/*neu* oncogene. The cytotoxicity of the TA.1-maytansinoid conjugate was tested *in vitro* on the human breast cancer cell line SK-BR-3, which expresses 3×10^5 HER-2 surface antigens per cell. The drug conjugate achieved a degree of cytotoxicity similar to the free maytansinoid drug, which could be increased by increasing the number of maytansinoid molecules per antibody molecule. The A7-maytansinoid conjugate showed low systemic cytotoxicity in mice.

Antibody-maytansinoid conjugates (immunoconjugates)

Antibody-maytansinoid conjugates are prepared by chemically linking an antibody to a maytansinoid molecule without significantly diminishing the biological activity of either the antibody or the maytansinoid molecule. An average of 3-4 maytansinoid molecules conjugated per antibody molecule has shown efficacy in enhancing cytotoxicity of target cells without negatively affecting the function or solubility of the antibody, although even one molecule of toxin/antibody would be expected to enhance cytotoxicity over the use of naked antibody. Maytansinoids are well known in the art and can be synthesized by known techniques or isolated from natural sources. Suitable maytansinoids are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,208,020 and in the other patents and nonpatent publications referred to hereinabove. Preferred maytansinoids are maytansinol and maytansinol analogues modified in the aromatic ring or at other positions of the maytansinol molecule, such as various maytansinol esters.

There are many linking groups known in the art for making antibody-maytansinoid conjugates, including, for example, those disclosed in U.S. Patent No. 5,208,020 or EP Patent 0 425 235 B1, and Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992). The linking groups include disulfide

a3

groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups, or esterase labile groups, as disclosed in the above-identified patents, disulfide and thioether groups being preferred.

Conjugates of the antibody and maytansinoid may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). Particularly preferred coupling agents include N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) and N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP) to provide for a disulfide linkage.

The linker may be attached to the maytansinoid molecule at various positions, depending on the type of the link. For example, an ester linkage may be formed by reaction with a hydroxyl group using conventional coupling techniques. The reaction may occur at the C-3 position having a hydroxyl group, the C-14 position modified with hydroxymethyl, the C-15 position modified with a hydroxyl group, and the C-20 position having a hydroxyl group. In a preferred embodiment, the linkage is formed at the C-3 position of maytansinol or a maytansinol analogue.

Calicheamicin

Another immunoconjugate of interest comprises an antibody conjugated to one or more calicheamicin molecules. The calicheamicin family of antibiotics are capable of producing double-stranded DNA breaks at sub-picomolar concentrations. For the preparation of conjugates of the calicheamicin family, see U.S. patents 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (all to American Cyanamid Company). Structural analogues of calicheamicin which may be used include, but are not limited to, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetyl- γ_1^I , PSAG and θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) and the aforementioned U.S. patents to American Cyanamid). Another anti-tumor drug that the antibody can be conjugated is QFA which is an antifolate. Both calicheamicin and QFA have intracellular sites of action and do not readily cross the plasma membrane. Therefore, cellular uptake of these agents through antibody mediated internalization greatly enhances their cytotoxic effects.

Other cytotoxic agents

Other antitumor agents that can be conjugated to the antibodies of the invention include BCNU, streptozocin, vincristine and 5-fluorouracil, the family of agents known collectively LL-E33288 complex described in U.S. patents 5,053,394, 5,770,710, as well as esperamicins (U.S. patent 5,877,296).

Enzymatically active toxins and fragments thereof which can be used include diphtheria A

chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomyacin, enomyacin and the tricothecenes. See, for example, WO 93/21232 published October 28, 1993.

The present invention further contemplates an immunoconjugate formed between an antibody and a compound with nucleolytic activity (e.g., a ribonuclease or a DNA endonuclease such as a deoxyribonuclease; DNase).

For selective destruction of the tumor, the antibody may comprise a highly radioactive atom. A variety of radioactive isotopes are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} and radioactive isotopes of Lu. When the conjugate is used for detection, it may comprise a radioactive atom for scintigraphic studies, for example tc^{99m} or I^{123} , or a spin label for nuclear magnetic resonance (NMR) imaging (also known as magnetic resonance imaging, mri), such as iodine-123 again, iodine-131, indium-111, fluorine-19, carbon-13, nitrogen-15, oxygen-17, gadolinium, manganese or iron.

The radio- or other labels may be incorporated in the conjugate in known ways. For example, the peptide may be biosynthesized or may be synthesized by chemical amino acid synthesis using suitable amino acid precursors involving, for example, fluorine-19 in place of hydrogen. Labels such as tc^{99m} or I^{123} , Re^{186} , Re^{188} and In^{111} can be attached via a cysteine residue in the peptide. Yttrium-90 can be attached via a lysine residue. The IODOGEN method (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 can be used to incorporate iodine-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describes other methods in detail.

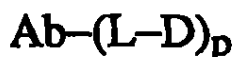
Conjugates of the antibody and cytotoxic agent may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026. The linker may be a "cleavable linker" facilitating release of the cytotoxic drug in the cell. For example, an acid-labile linker, peptidase-sensitive linker, photolabile linker, dimethyl linker or disulfide-containing linker (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); U.S. Patent No. 5,208,020) may be used.

95

The compounds of the invention expressly contemplate, but are not limited to, ADC prepared with cross-linker reagents: 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, and sulfo-SMPB, and SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoate) which are commercially available (e.g., from Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). See pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparation of antibody drug conjugates

In the antibody drug conjugates (ADC) of the invention, an antibody (Ab) is conjugated to one or more drug moieties (D), e.g. about 1 to about 20 drug moieties per antibody, through a linker (L). The ADC of Formula I may be prepared by several routes, employing organic chemistry reactions, conditions, and reagents known to those skilled in the art, including: (1) reaction of a nucleophilic group of an antibody with a bivalent linker reagent, to form Ab-L, via a covalent bond, followed by reaction with a drug moiety D; and (2) reaction of a nucleophilic group of a drug moiety with a bivalent linker reagent, to form D-L, via a covalent bond, followed by reaction with the nucleophilic group of an antibody.



I

Nucleophilic groups on antibodies include, but are not limited to: (i) N-terminal amine groups, (ii) side chain amine groups, e.g. lysine, (iii) side chain thiol groups, e.g. cysteine, and (iv) sugar hydroxyl or amino groups where the antibody is glycosylated. Amine, thiol, and hydroxyl groups are nucleophilic and capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides; (ii) alkyl and benzyl halides such as halosuccinamides; (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups. Certain antibodies have reducible interchain disulfides, i.e. cysteine bridges. Antibodies may be made reactive for conjugation with linker reagents by treatment with a reducing agent such as DTT (dithiothreitol). Each cysteine bridge will thus form, theoretically, two reactive thiol nucleophiles. Additional nucleophilic groups can be introduced into antibodies through the reaction of lysines with 2-iminothiolane (Traut's reagent) resulting in conversion of an amine into a thiol.

Antibody drug conjugates of the invention may also be produced by modification of the antibody to introduce electrophilic moieties, which can react with nucleophilic substituents on the linker reagent or drug. The sugars of glycosylated antibodies may be oxidized, e.g. with periodate oxidizing reagents, to form aldehyde or ketone groups which may react with the amine group of linker reagents or drug moieties. The resulting imine Schiff base groups may form a stable linkage, or may be reduced, e.g. by borohydride reagents to form stable amine linkages. In one embodiment, reaction

of the carbohydrate portion of a glycosylated antibody with either galactose oxidase or sodium meta-periodate may yield carbonyl (aldehyde and ketone) groups in the protein that can react with appropriate groups on the drug (Hermanson, Bioconjugate Techniques). In another embodiment, proteins containing N-terminal serine or threonine residues can react with sodium meta-periodate, resulting in production of an aldehyde in place of the first amino acid (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Such aldehyde can be reacted with a drug moiety or linker nucleophile.

Likewise, nucleophilic groups on a drug moiety include, but are not limited to: amine, thiol, hydroxyl, hydrazide, oxime, hydrazine, thiosemicarbazone, hydrazine carboxylate, and arylhydrazide groups capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides; (ii) alkyl and benzyl halides such as haloacetamides; (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups.

Alternatively, a fusion protein comprising the antibody and cytotoxic agent may be made, e.g., by recombinant techniques or peptide synthesis. The length of DNA may comprise respective regions encoding the two portions of the conjugate either adjacent one another or separated by a region encoding a linker peptide which does not destroy the desired properties of the conjugate.

In yet another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pre-targeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) which is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionucleotide).

Antibody Derivatives

The antibodies of the present invention can be further modified to contain additional nonproteinaceous moieties that are known in the art and readily available. Preferably, the moieties suitable for derivatization of the antibody are water soluble polymers. Non-limiting examples of water soluble polymers include, but are not limited to, polyethylene glycol (PEG), copolymers of ethylene glycol/propylene glycol, carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, poly-1, 3-dioxolane, poly-1,3,6-trioxane, ethylene/maleic anhydride copolymer, polyaminoacids (either homopolymers or random copolymers), and dextran or poly(n-vinyl pyrrolidone)polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), polyvinyl alcohol, and mixtures thereof. Polyethylene glycol propionaldehyde may have advantages in manufacturing due to its stability in water. The polymer may be of any molecular weight, and may be branched or unbranched. The number of polymers attached to the antibody may vary, and if more than one polymers are attached, they can be the same or different molecules. In general, the number and/or type of polymers used for derivatization can be determined based on considerations including, but not limited to, the particular

properties or functions of the antibody to be improved, whether the antibody derivative will be used in a therapy under defined conditions, etc.

Pharmaceutical Formulations

Therapeutic formulations comprising an antibody of the invention are prepared for storage by mixing the antibody having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of aqueous solutions, lyophilized or other dried formulations. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, histidine and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG).

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsule prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsule and poly-(methylmethacrylate) microcapsule, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the immunoglobulin of the invention, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsule. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate,

degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated immunoglobulins remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

Uses

An antibody of the present invention may be used in, for example, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* therapeutic methods. Antibodies of the invention can be used as an antagonist to partially or fully block the specific antigen activity *in vitro*, *ex vivo* and/or *in vivo*. Moreover, at least some of the antibodies of the invention can neutralize antigen activity from other species. Accordingly, the antibodies of the invention can be used to inhibit a specific antigen activity, e.g., in a cell culture containing the antigen, in human subjects or in other mammalian subjects having the antigen with which an antibody of the invention cross-reacts (e.g. chimpanzee, baboon, marmoset, cynomolgus and rhesus, pig or mouse). In one embodiment, the antibody of the invention can be used for inhibiting antigen activities by contacting the antibody with the antigen such that antigen activity is inhibited. Preferably, the antigen is a human protein molecule.

In one embodiment, an antibody of the invention can be used in a method for inhibiting an antigen in a subject suffering from a disorder in which the antigen activity is detrimental, comprising administering to the subject an antibody of the invention such that the antigen activity in the subject is inhibited. Preferably, the antigen is a human protein molecule and the subject is a human subject. Alternatively, the subject can be a mammal expressing the antigen with which an antibody of the invention binds. Still further the subject can be a mammal into which the antigen has been introduced (e.g., by administration of the antigen or by expression of an antigen transgene). An antibody of the invention can be administered to a human subject for therapeutic purposes. Moreover, an antibody of the invention can be administered to a non-human mammal expressing an antigen with which the immunoglobulin cross-reacts (e.g., a primate, pig or mouse) for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (e.g., testing of dosages and time courses of administration). Blocking antibodies of the invention that are therapeutically useful include, for example but are not limited to, anti-HHR2, anti-VEGF, anti-IgE, anti-CD11, anti-interferon and anti-tissue factor antibodies. The antibodies of the invention can be used to treat,

inhibit, delay progression of, prevent/delay recurrence of, ameliorate, or prevent diseases, disorders or conditions associated with abnormal expression and/or activity of one or more antigen molecules, including but not limited to malignant and benign tumors; non-leukemias and lymphoid malignancies; neuronal, glial, astrocytal, hypothalamic and other glandular, macrophagal, epithelial, stromal and blastocoelic disorders; and inflammatory, angiogenic and immunologic disorders.

In one aspect, a blocking antibody of the invention is specific to a ligand antigen, and inhibits the antigen activity by blocking or interfering with the ligand-receptor interaction involving the ligand antigen, thereby inhibiting the corresponding signal pathway and other molecular or cellular events. The invention also features receptor-specific antibodies which do not necessarily prevent ligand binding but interfere with receptor activation, thereby inhibiting any responses that would normally be initiated by the ligand binding. The invention also encompasses antibodies that either preferably or exclusively bind to ligand-receptor complexes. An antibody of the invention can also act as an agonist of a particular antigen receptor, thereby potentiating, enhancing or activating either all or partial activities of the ligand-mediated receptor activation.

In certain embodiments, an immunoconjugate comprising an antibody conjugated with a cytotoxic agent is administered to the patient. In some embodiments, the immunoconjugate and/or antigen to which it is bound is/are internalized by the cell, resulting in increased therapeutic efficacy of the immunoconjugate in killing the target cell to which it binds. In one embodiment, the cytotoxic agent targets or interferes with nucleic acid in the target cell. Examples of such cytotoxic agents include any of the chemotherapeutic agents noted herein (such as a maytansinoid or a calicheamicin), a radioactive isotope, or a ribonuclease or a DNA endonuclease.

Antibodies of the invention can be used either alone or in combination with other compositions in a therapy. For instance, an antibody of the invention may be co-administered with another antibody, chemotherapeutic agent(s) (including cocktails of chemotherapeutic agents), other cytotoxic agent(s), anti-angiogenic agent(s), cytokines, and/or growth inhibitory agent(s). Where an antibody of the invention inhibits tumor growth, it may be particularly desirable to combine it with one or more other therapeutic agent(s) which also inhibits tumor growth. For instance, an antibody of the invention may be combined with an anti-VEGF antibody (e.g., AVASTIN) and/or anti-ErbB antibodies (e.g. HERCEPTIN® anti-HER2 antibody) in a treatment scheme, e.g. in treating any of the diseases described herein, including colorectal cancer, metastatic breast cancer and kidney cancer. Alternatively, or additionally, the patient may receive combined radiation therapy (e.g. external beam irradiation or therapy with a radioactive labeled agent, such as an antibody). Such combined therapies noted above include combined administration (where the two or more agents are included in the same or separate formulations), and separate administration, in which case, administration of the antibody of the invention can occur prior to, and/or following, administration of the adjunct therapy or therapies.

24 100

The antibody of the invention (and adjunct therapeutic agent) is/are administered by any suitable means, including parenteral, subcutaneous, intraperitoneal, intrapulmonary, and intranasal, and, if desired for local treatment, intralesional administration. Parenteral infusions include intramuscular, intravenous, intraarterial, intraperitoneal, or subcutaneous administration. In addition, the antibody is suitably administered by pulse infusion, particularly with declining doses of the antibody. Dosing can be by any suitable route, e.g. by injections, such as intravenous or subcutaneous injections, depending in part on whether the administration is brief or chronic.

The antibody composition of the invention will be formulated, dosed, and administered in a fashion consistent with good medical practice. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the agent, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners. The antibody need not be, but is optionally formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the disorder in question. The effective amount of such other agents depends on the amount of antibodies of the invention present in the formulation, the type of disorder or treatment, and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with administration routes as used hereinbefore or about from 1 to 99% of the heretofore employed dosages.

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of an antibody of the invention (when used alone or in combination with other agents such as chemotherapeutic agents) will depend on the type of disease to be treated, the type of antibody, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments. Depending on the type and severity of the disease, about 1 μ g/kg to 15 mg/kg (e.g. 0.1mg/kg-10mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. One typical daily dosage might range from about 1 μ g/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. One exemplary dosage of the antibody would be in the range from about 0.05mg/kg to about 10mg/kg. Thus, one or more doses of about 0.5mg/kg, 2.0mg/kg, 4.0mg/kg or 10mg/kg (or any combination thereof) may be administered to the patient. Such doses may be administered intermittently, e.g. every week or every three weeks (e.g. such that the patient receives from about two to about twenty, e.g. about six doses of the antibody). An initial higher loading dose, followed by one or more lower doses may be administered. An exemplary dosing regimen comprises administering an initial loading dose of about 4 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 2 mg/kg of the antibody. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by

conventional techniques and assays.

Articles of Manufacture

In another aspect of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment, prevention and/or diagnosis of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label or package insert on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, etc. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is by itself or when combined with another composition effective for treating, preventing and/or diagnosing the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is an antibody of the invention. The label or package insert indicates that the composition is used for treating the condition of choice, such as cancer. Moreover, the article of manufacture may comprise (a) a first container with a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody of the invention; and (b) a second container with a composition contained therein, wherein the composition comprises a further cytotoxic agent. The article of manufacture in this embodiment of the invention may further comprise a package insert indicating that the first and second antibody compositions can be used to treat a particular condition, e.g. cancer. Alternatively, or additionally, the article of manufacture may further comprise a second (or third) container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWFI), phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes.

The following are examples of the methods and compositions of the invention. It is understood that various other embodiments may be practiced, given the general description provided above.

EXAMPLES

Materials and Methods

Residue numbers are according to Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Single letter amino acid abbreviations are used. DNA degeneracies are represented using the IUB code (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 = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

Direct hypervariable region grafts onto the acceptor human consensus framework -- The phagemid used for this work is a monovalent Fab-g3 display vector (pV0350-2B) having 2 open reading frames under control of the phoA promoter, essentially as described in Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93. The first open reading frame consists of the stII signal sequence fused to the VL and CH1 domains acceptor light chain and the second consists of the stII signal sequence fused to the VH and CH1 domains of the acceptor heavy chain followed by a truncated minor phage coat

protein P3. See Lee et al., *supra*.

The VL and VH domains from murine 5D5 (see hybridoma 5D5.11.6, ATCC Deposit No. HB-11895, deposit date May 23, 1995) were aligned with the human consensus kappa I (huKI) and human subgroup III consensus VH (huIII) domains. To make the HVR graft, the acceptor VH
5 framework, which differs from the human subgroup III consensus VH domain at 3 positions: R71A, N73T, and L78A (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992)) was used. Hypervariable regions from the murine 5D5 (mu5D5) antibody were engineered into the acceptor human consensus framework to generate a direct HVR-graft of 5D5 (5D5 graft). In the VL domain the following regions were grafted to the human consensus acceptor: positions 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97
10 (L3). In the VH domain, positions 26-35 (H1), 49-65 (H2) and 95-102 (H3) were grafted (Figure 1).

The direct-graft variants were generated by Kunkel mutagenesis using a separate oligonucleotide for each hypervariable region. Correct clones were assessed by DNA sequencing.

Soft randomization of the hypervariable regions – Sequence diversity was introduced into each hypervariable region using a soft randomization strategy that maintains a bias towards the
15 murine hypervariable region sequence. This was accomplished using a poisoned oligonucleotide synthesis strategy as described by Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:1233-1251 (1994). For a given position within a hypervariable region to be mutated, the codon encoding the wild-type amino acid is poisoned with a 70-10-10-10 mixture of nucleotides resulting in an average 50 percent mutation rate at each position.

20 Soft randomized oligonucleotides were patterned after the murine hypervariable region sequences and encompassed the same regions defined by the direct hypervariable region grafts. The amino acid position at the beginning of H2 (position 49) in the VH domain, was limited in sequence diversity to A, G, S or T by using the codon RGC.

Generation of phage libraries - Randomized oligonucleotide pools designed for each
25 hypervariable region were phosphorylated separately in six 20 µl reactions containing 660 ng of oligonucleotide, 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 20 mM DTT, and 5 U polynucleotide kinase for 1 h at 37°C. The six phosphorylated oligonucleotide pools were then combined with 20 µg of Kunkel template in 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂ in a final volume of 500 µl resulting in a oligonucleotide to template ratio of 3. The mixture was annealed at 90 °C for 4
30 min, 50 °C for 5 min and then cooled on ice. Excess, unannealed oligonucleotide was removed with a QIAQUICK PCR purification kit (Qiagen kit 28106) using a modified protocol to prevent excessive denaturation of the annealed DNA. To the 500 µl of annealed mixture, 150 µl of PB was added, and the mixture was split between 2 silica columns. Following a wash of each column with 750 µl of PB and an extra spin to dry the columns, each column was eluted with 110 µl of 10 mM Tris, 1 mM
35 EDTA, pH 8. The annealed and cleaned-up template (220 µl) was then filled in by adding 1 µl 100mM ATP, 10 µl 25mM dNTPs (25mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 15 µl 100mM DTT, 25 µl 10X TM buffer (0.5 M Tris pH 7.5, 0.1 M MgCl₂), 2400 U T4 ligase, and 30 U T7

polymerase for 3 h at room temperature.

The filled in product was analyzed on Tri-Acetate-EDTA/agarose gels (Sidhu *et al.*, *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000)). Three bands were usually visible: the bottom band is a correctly filled and ligated product, the middle band is a filled but unligated product, and the top band is a strand displaced product. The top band is produced by an intrinsic side activity of T7 polymerase and is difficult to avoid (Lechner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 258:11174-11184 (1983)); however, this band transforms 30-fold less efficiently than the bottom band and usually contributes little to the library. The middle band is due to the absence of a 5' phosphate for the final ligation reaction; this band transforms efficiently and gives mainly wild type sequence.

The filled in product was then cleaned-up and electroporated into SS320 cells and propagated in the presence of M13/KO7 helper phage as described by Sidhu *et al.*, *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000). Library sizes ranged from $1 - 2 \times 10^9$ independent clones. Random clones from the initial libraries were sequenced to assess library quality.

Phage Selection – The human HGF receptor was generated and used as an Fc fusion (HGFR-Fc) (Mark *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1992), 267:26166-26171). HGFR-Fc was coated on MaxiSorp microtiter plates (Nunc) at 5 µg/ml in PBS. For the first round of selection 8 wells of target were used; a single well of target was used for successive rounds of selection. Wells were blocked for 1 h using Casein Blocker (Pierce). Phage were harvested from the culture supernatant and suspended in PBS containing 1 % BSA and 0.05 % TWEEN 20 (PBST). After binding to the wells for 2 h, unbound phage were removed by extensive washing with PBS containing 0.05 % TWEEN 20 (PBST). Bound phage were eluted by incubating the wells with 50 mM HCl, 0.5 M KCl for 30 min. Phage were amplified using Top10 cells and M13/KO7 helper phage and grown overnight at 37 °C in 2YT, 50 µg/ml carbanecillin. The titers of phage eluted from a target coated well were compared to titers of phage recovered from a non-target coated well to assess enrichment.

For affinity maturation, phage libraries were sorted using a solution sorting method. HGFR-Fc was biotinylated by mixing 500 µl of 3.6 mg/ml HGFR-Fc in PBS, and 10 µl of 1 M Potassium phosphate, pH 8 with 20 µl 4 mM Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce). Biotinylated HGFR-Fc (b-HGFR-Fc) was purified using a NAP5 column (Amersham Biosciences) in PBS. Microtiter wells were coated with 10 µg/ml neutravidin in PBS overnight at 4°C and then blocked for 1 h using Casein Blocker (Pierce). In the first round of panning, 200 µl phage suspended in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST) and 1 % BSA were mixed with 10 nM b-HGFR-Fc for 1 hr. Phage bound to b-HGFR-Fc were captured on neutravidin coated wells for 10 min and unbound phage were washed away with PBST. Phage were eluted using 20 mM HCl, 500 mM KCl for 45 m, neutralized, and propagated in XL1 blue cells (Stratagene) in the presence of KO7 helper phage (New England Biolabs). Subsequent rounds of sorting were performed similarly with the following exceptions: in round 2 the final b-HGFR-Fc concentration was 5.6 nM, in round 3 the final b-HGFR-Fc concentration was 0.1 nM, in round 4 the final b-HGFR-Fc concentration was 0.5 nM and 780 nM unbiotinylated HGFR-Fc was added to the

104

mixture for 1 h prior to capture on neutravidin.

Phage ELISA – MaxiSorp microtiter plates were coated with human HGFR-Fc at 5 µg/ml in PBS over night and then blocked with Casein Blocker. Phage from culture supernatants were incubated with serially diluted HGFR-Fc in PBST containing 1 % BSA in a tissue culture microtiter plate for 1 h after which 80 µl of the mixture was transferred to the target coated wells for 15 min to capture unbound phage. The plate was washed with PBST and HRP conjugated anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech) was added (1:5000 in PBST containing 1 % BSA) for 40 min. The plate was washed with PBST and developed by adding Tetramethylbenzidine substrate (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). The absorbance at 405 nm was plotted as a function of target concentration in solution to determine an IC₅₀. This was used as an affinity estimate for the Fab clone displayed on the surface of the phage.

Fab Production and Affinity Determination—To express Fab protein for affinity measurements, a stop codon was introduced between the heavy chain and g3 in the phage display vector. Clones were transformed into E. coli 34B8 cells and grown in AP5 media at 30 C (Presta et al. *Cancer Res.* 57: 4593-4599 (1997)). Cells were harvested by centrifugation, suspended in 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8 and broken open using a microfluidizer. Fab was purified with Protein G affinity chromatography.

Affinity determinations were performed by surface plasmon resonance using a BIAcore™-2000. HGFR-Fc was immobilized (~1000 response units (RU)) on a CM5 chip and varied concentrations of Fab (4 to 500 nM) in PBST were injected. After each injection the chip was regenerated using 100 mM HCl. Binding response was corrected by subtracting the RU from a blank flow cell. A 1:1 Langmuir model of simultaneous fitting of k_{on} and k_{off} was used for kinetics analysis.

Electro-chemiluminescent assay for OA5D5 blocking of HGF / cMet binding

Purified cMet-Ig protein produced at Genentech (South San Francisco, CA) was biotinylated by incubating with 20-fold molar excess NHS-X-Biotin in 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5 using biotin-X-NHS (Research Organics, Cleveland, OH). Purified human 2-chain HGF produced at Genentech was labeled with BV-TAG (cat # 110034) via NHS-ester chemistry according to manufacturer's directions (BioVeris International, Gaithersburg, MD). cMet-Ig-biotin (500 ng/mL), HGF-Ruthenium Tag (250 ng/mL), and titrations of OA5D5 antibody ranging from 3333-0.21 nM of antibody were incubated together in a volume of 100 µl of assay diluent: PBS + 0.5% BSA / 0.5% Tween 20 / 0.033% Proclin (Supelco Inc. Bellefonte PA). The mixtures were incubated in sealed polypropylene round bottom 96 well plates (Corning) for 2-4 hours at room temperature with shaking. Streptavidin magnetic beads (Dynabeads, BioVeris) were added. Following a final 45 min incubation with vigorous shaking, the plates were read using a BioVeris M-Series instrument (BioVeris International, Gaithersburg, MD).

KIRA (HGF-dependent -Met Phosphorylation)

A549 cells (ATCC, Manassas, VA) were maintained in growth medium (Ham's F12/DMEM

105

50:50 [Gibco, Grand Island, NY] containing 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, St. Louis, MO). To prepare cells for the assay, cells from confluent cultures were detached using Accutase (ICN, Aurora, OH) and seeded into 96 well plates at a density of 50,000 cells per well. After an overnight incubation at 37°C, growth media was removed and cells were serum starved for 30 – 60 min in medium containing 0.1% FBS. To determine the ability of OA-5D5 to inhibit cMet phosphorylation, the molecule was serially diluted from 200 to 0.19 nM in medium + 0.1% FBS and added to the assay plates. After a 15 min incubation at 37°C, HGF (50 ng/ml) was added. The plates were then incubated for an additional 10 minutes at 37°C, the media was removed and a cell lysis buffer was added (Cell Signaling Technologies, Cat # 9803, Beverly, MA; supplemented with a protease inhibitor cocktail purchased from Calbiochem, Cat #539131, San Diego, CA). The lysates were analyzed for phosphorylated c-Met via an electrochemiluminescence assay using an BioVeris M-Series instrument (BioVeris International, Gaithersburg, MD). An anti-phosphotyrosine mAb (clone 4G10, Upstate, Lake Placid, NY) was labeled with BV-TAG via NHS-ester chemistry according to manufacturer's directions (BioVeris). Antibodies against the c-Met extracellular domain were biotinylated using biotin-X-NHS (Research Organics, Cleveland, OH). The BV-TAG-labeled 4G10 and biotinylated anti-c-Met mAb were diluted in assay buffer (PBS / 0.5% Tween-20 / 0.5% BSA) and added as a cocktail to the cell lysates. After a 1.5 - 2 hr incubation at room temperature with vigorous shaking, streptavidin magnetic beads (Dynabeads, BioVeris) were added. Following a final 45 min incubation, the plates were read on the BioVeris instrument.

Cell Culture and proliferation assay

BaF3 is a murine IL-3 dependent lymphoid cell that normally does not express cMet and does not respond to HGF. However, in BaF3-hMet derived by transfection with a normal, full-length cDNA for human c-Met (Schwall et al., *J. Cell Biol.* (1996), 133:709-718), HGF stimulates proliferation and survival in the absence of IL-3. BaF3-hMet and BaF3-neo cells were routinely passaged in RPMI 1640, 5% fetal bovine serum, 4 µl/L β-mercapthoethanol, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulfate, 2 mM L-glutamine, and 5% WEHI-conditioned medium as a source of IL-3. To measure HGF-dependent proliferation the number of cells after 3 days of treatment was quantitated by adding 25 µl Alarma Blue (Trek Diagnostic Systems; Cleveland, OH) and measuring fluorescence intensity 6 hours later. Control experiments were proliferation of these cells in the absence of HGF. H358-PSF2 and HGF-PSF8 cells were passaged in RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulfate, 2 mM L-glutamine. The assay medium was RPMI 1640 plus 0.1%, 0.5% BSA, or 10% FBS respectively. The assay was performed as described above.

Immunoprecipitation and Western Blot

H358 cells are a cell line derived from human non-small cell lung carcinoma (NSCLC). H358-PSF2, H358-PSF8 cells are human HGF stable transfected H358 cells (Tsao et al., *Neoplasia*, Vol.2, No.3, 2000), and were cultured in RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin,

100 µg/ml streptomycin sulfate, 2 mM L-glutamine. cMet tyrosine phosphorylation detection was performed essentially as described previously (Zioncheck, J Bio Chem, 270(28):16871-8, 1995). In brief, cells were plated in 60-mm plates overnight, and medium was changed to RPMI 1640 containing 0.5% BSA, before adding the combinations of with or without 1nM HGF or competitor
5 OA5D5.v2 antibody. After 10 min at 37 °C, medium was removed and cells were lysed using lysis buffer (150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1x protease inhibitor cocktail, 1X phosphatase inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO)). After spinning, the supernatant of the lysate was incubated with anti-cMet IgG polyclonal antibody (c-28; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) bound to protein G-Sepharose for 1 hour at 4 °C. The immune complexes were washed and
10 boiled in 1x sample buffer, before separation by SDS-PAGE and electroblotting to nitrocellulose. Phosphotyrosine-containing proteins were visualized using an anti-phosphotyrosine antibody (4G10; Upstate Biotechnology, Waltham, MA) followed by HRP-conjugated goat anti-mouse Fab (1:10,000; Jackson Labs, West Grove, PA), and in the case of total cMet using c-28 antibody (1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) followed by goat anti-rabbit Fc-HRP (1:10,000; Jackson Labs, West
15 Grove, PA) with chemiluminescence detection.

Tumor xenograft study

Athymic female mice were inoculated subcutaneously with 5 million KP4 pancreatic carcinoma cells. When tumors reached 150-200 mm³, mice were assigned to 2 groups of 10. Group 1 was injected IP with vehicle twice per week. Group 2 was injected IP with OA5D5.v2, 30 mg/kg,
20 twice per week. Tumor size was measured twice per week. Mice were sacrificed when tumor volume exceeded two-times the starting tumor volume, or if the tumor ulcerated.

Results and Discussion

Humanization of 5D5 - The human acceptor framework used for the humanization of 5D5
25 comprises the consensus human kappa I VL domain and a variant of the human subgroup III consensus VH domain. The variant VH domain has 3 changes from the human consensus: R71A, N73T and L78A. The VL and VH domains of murine 5D5 were aligned with the human kappa I and subgroup III domains; each HVR was identified and then grafted into the human acceptor framework to generate a 5D5 graft that could be displayed as an Fab on phage. When phage displaying the 5D5
30 graft were tested for binding to immobilized HGFR-Fc, no binding was observed.

A library was generated in which each of the HVR regions of the 5D5 graft was soft randomized. This library was panned against immobilized HGFR-Fc for 4 rounds of selection. Clones were picked for DNA sequence analysis and revealed a single clone had been selected. This clone had a single change in the VH domain at position 94 (R94S) just outside the intended region of
35 HVR-H3 targeted for mutagenesis. Analysis of this clone by phage ELISA indicated it had similar affinity to that of the monovalent affinity of murine 5D5. When expressed as an Fab and tested by Biacore, the K_d was determined to be 9.8 nM compared to 8.3 nM for the monovalent affinity of

murine 5D5. Thus this unexpected substitution restores full binding affinity to the 5D5 graft, and the 5D5 graft plus R94S (hu5D5.v1) represents a fully humanized antibody. Interestingly, a homologous amino acid, threonine, is found at this position in the murine antibody. MacCallum et al. (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) have analyzed antibody and antigen complex crystal structures and found positions 93 and 94 of the heavy chain are part of the contact region thus it seems reasonable to include these positions in the definition of hypervariable region of H3 (HVR-H3) when humanizing antibodies.

Affinity maturation of hu5D5.v1 – To improve the affinity of hu5D5.v1, six phage display libraries were generated in the background of hu5D5.v1, each targeting a single HVR for soft randomization. To avoid re-selecting hu5D5.v1 from a potential high background of wild-type template, stop codons were introduced into the HVR to be mutated prior to generating each library. A solution sorting method was used to enhance the efficiency of the affinity-based phage selection process. By manipulating the biotinylated target concentration, reducing the phage capture time to lower backgrounds and the addition of unbiotinylated target to eliminate clones with faster off rates, high affinity clones can be proficiently selected. Lee et al., *supra*. From the first round of selection, enrichment (target dependent phage capture) was observed suggesting a large number of clones were present in each library with reasonably high affinity for HGFR-Fc. Selection stringency (see Methods above) was increased in subsequent rounds and at round 3 all 6 libraries were combined to generate a seventh library pool. After 4 rounds of selection, clones from each of the 7 library pools were analyzed. All clones in the libraries targeting HVR-L1 and HVR-L3 were identical to hu5D5.v1; however, new sequences were observed in libraries targeting HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3 (Figure 2). The library pool consisting of the combination of all 6 libraries was dominated by sequences from the HVR-H3 library suggesting that these sequences provided the largest improvement in affinity for HGFR-Fc (Figure 3). Selected clones were screened by phage ELISA and then expressed as Fab protein and their affinity determined using Biacore. Several clones from the combined library with changes in HVR-H3 had improved affinities compared to hu5D5.v1 or the murine 5D5 monovalent affinity (Figure 4). These clones had either S/T at position 94, R/S at position 96 and T/S at position 100 and P/S/A at position 100a. The best clone, clone 78 (hu5D5.v2) had 3 changes from hu5D5.v1 (94T, 96R and 100T) and a 13-fold affinity improvement.

Thus starting from the graft of the 6 murine 5D5 HVRs into the human acceptor scaffold, the expansion of HVR-H3 to include position 94 (Threonine) and the addition of 2 changes in HVR-H3 leads to a fully human 5D5 antibody with 13-fold improved binding affinity for HGFR. Furthermore, selected humanized antibodies described herein have been determined to have at least comparable biological activity as the parent 5D5 antibody, for example in receptor phosphorylation assays, etc. (data not shown).

Characterization of an antibody of the invention – “One-armed” (also referred to as “one-arm” and “OA”) anti-Met antibodies were characterized. Two antibodies of the invention were tested.

Specifically, the "OA-5D5.v2" antibody comprised a single Fab arm comprising variable domain sequences as depicted in Figure 13, wherein the Fab arm was fused to an Fc region, and wherein the Fc region was a complex between one Fc polypeptide comprising the Fc sequence depicted in Figure 13 and one Fc polypeptide comprising the Fc sequence depicted in Figure 14. The antibodies were characterized as follows:

- (1) In an assay to test ability of OA-5D5.v2 to block binding of HGF to its receptor, OA-5D5.v2 was able to block HGF binding to its receptor at least as well as two comparator antibodies – namely a chimeric one-armed antibody (which comprised a Fab arm from the murine parent 5D5 antibody (variable domains depicted in Figure 7) fused to a human Fc region), and another antibody of the invention (OA- 5D5.v1). When tested across an antibody concentration range of about 3333 to 0.21 nM, under conditions as described in the Materials and Methods section above, OA-5D5.v2 was found to have an IC₅₀ value that was less than about half that of a comparator antibody such as the chimeric one-armed antibody and OA-5D5.v1. Notably, OA-5D5.v1 also blocked with better IC₅₀ than the reference chimeric antibody. See Figure 8.
- (2) In an assay to test ability of OA-5D5.v2 to inhibit HGF receptor activation, OA-5D5.v2 was able to inhibit kinase receptor activation at least as well as the two comparator antibodies as described in (1) above. When tested across an antibody concentration range of about 200 to 0.19 nM, under conditions as described in the Materials and Methods section above, OA-5D5.v2 was found to have an IC₅₀ with a value that was less than about half that of a comparator antibody such as the chimeric one-armed antibody and OA-5D5.v1. See Fig. 9.
- (3) OA-5D5.v2 was also tested for cross-species binding among human, primate (cynomolgus monkey), canine and murine (mouse). OA-5D5.v2 was found to bind specifically to human and primate (cynomolgus monkey) HGF receptor, but not canine or murine (mouse). (data not shown.)
- (4) OA-5D5.v2 was tested for its ability to inhibit cell proliferation in the presence of HGF. As shown in Figure 10, OA-5D5.v2 inhibited cell proliferation at least as well as its chimeric antibody counterpart and OA-5D5.v1 (as described in (1) above). When tested across an antibody concentration range of about 0.01 to 100 nM, under conditions as described in the Materials and Methods section above, OA-5D5.v2 was found to have an IC₅₀ value that was less than about half that of a comparator antibody such as the chimeric one-armed antibody and OA-5D5.v1. See Fig. 10. Specific binding of OA-5D5.v2 to the Met-transfected cells was confirmed by FACs analysis. (data not shown)

- (5) OA-5D5.v2 was tested for its ability to inhibit receptor tyrosine phosphorylation in the presence of HGF. As shown in Figures 11A and B, OA-5D5.v2 inhibited receptor tyrosine phosphorylation when tested at antibody concentrations from about 10 to 1000 nM. See Fig. 11A and B.
- 5 (6) OA-5D5.v2 was tested for *in vivo* efficacy using a tumor xenograft model based on a pancreatic tumor cell line (KP4). Results from this efficacy study showed that the OA-5D5.v2 antibody was capable of inhibiting and causing regression of tumors *in vivo*. As shown in Fig. 12, there was complete loss of tumor in most of the animals treated with the antibody.

10 PARTIAL REFERENCE LIST

- Angeloni, D., Danilkovitch-Miagkova, A., Miagkov, A., Leonard, E. J., and Lerman, M. I. (2003). The soluble sema domain of the Ron receptor inhibits MSP-induced receptor 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.
- 15 Bardelli, A., Longati, P., Gramaglia, D., Stella, M. C., and Comoglio, P. M. (1997). Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires 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 HGF receptor. *Trends Biochem Sci* 28, 527-533.
- 20 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 immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell* 80, 103-113.
- 25 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., Kniecik, 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.
- 30 Bussolino, F., Di Renzo, M. F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffer, A., and Comoglio, P. M. (1992). 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.

5 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
10 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
15 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.

20 Gherardi, E., Youles, M. E., Miguel, R. N., Blundell, T. L., Iamle, 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.

25 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.

30 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., Lamazus, 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 Banouf, 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.

Peak, 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.

Pellicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C., Pellicci, P. G., and *et al*. (1995). The mitogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc 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.

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, L., 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., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyka, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., 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, I., Neumann, H. P., Branch, 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., Ha, 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.

Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 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.

CLAIMS

1. An anti-c-met antibody comprising:

(a) at least one HVR sequence selected from the group consisting of:

(i) HVR-L1 comprising sequence A1-A17, wherein A1-A17 is KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO:1)

(ii) HVR-L2 comprising sequence B1-B7, wherein B1-B7 is WASTRES (SEQ ID NO:2)

(iii) HVR-L3 comprising sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQYYAYPWT (SEQ ID NO:3)

(iv) HVR-H1 comprising sequence D1-D10, wherein D1-D10 is GYTFTSYWLH (SEQ ID NO:4)

(v) HVR-H2 comprising sequence E1-E18, wherein E1-E18 is GMIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO:5)

(vi) HVR-H3 comprising sequence F1-F11, wherein F1-F11 is XYGSYVSPLDY (SEQ ID NO:6) and X is not R; and

(b) at least one variant HVR, wherein the variant HVR comprises modification of at least one residue of the sequence depicted in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 or 6.

2. The antibody of claim 1, wherein F1 in a variant HVR-H3 is T or S, F3 is R or S and F7 is T.

3. The antibody of claim 1, wherein the antibody is humanized.

4. The antibody of claim 1, wherein at least a portion of the framework sequence is a human consensus framework sequence.

5. The antibody of claim 1, wherein said modification is substitution, insertion or deletion.

6. The antibody of claim 1, wherein a HVR-L2 variant comprises 1-5 (1, 2, 3, 4 or 5) substitutions in any combination of the following positions: B1 (M or L), B2 (P, T, G or S), B3 (N, G, R or T), B4 (I, N or F), B5 (P, I, L or G), B6 (A, D, T or V) and B7 (R, I, M or G).

7. The antibody of claim 1, wherein a HVR-H1 variant comprises 1-5 (1, 2, 3, 4 or 5) substitutions in any combination of the following positions: D3 (N, P, L, S, A, I), D5 (I, S or

Y), D6 (G, D, T, K, R), D7 (F, H, R, S, T or V) and D9 (M or V).

8. The antibody of claim 1, wherein a HVR-H2 variant comprises 1-4 (1, 2, 3 or 4) substitutions in any combination of the following positions: E7 (Y), E9 (I), E10 (I), E14 (T or Q), E15 (D, K, S, T or V), E16 (L), E17 (E, H, N or D) and E18 (Y, E or H).

5 9. The antibody of claim 1, wherein a HVR-H3 variant comprises 1-5 (1, 2, 3, 4 or 5) substitutions in any combination of the following positions: 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) and F11 (Q, S, H, F).

10. The antibody of claim 1 comprising an HVR-L1 having the sequence of SEQ ID NO:1.

10 11. The antibody of claim 1 comprising an HVR-L3 having the sequence of SEQ ID NO:3.

12. The antibody of claim 1, wherein F1 in a variant HVR-H3 is T.

13. The antibody of claim 1, wherein F3 in a variant HVR-H3 is R or S.

14. The antibody of claim 1, wherein F7 in a variant HVR-H3 is T.

15. A humanized anti-c-met antibody wherein monovalent affinity of the antibody to human c-met is substantially the same as monovalent affinity of a murine antibody comprising a light chain and heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10).

16. A humanized anti-c-met antibody wherein monovalent affinity of the antibody to human c-met is at least 3-fold greater than monovalent affinity of a murine antibody comprising a light chain and heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10).

20 17. The humanized antibody of claim 15 or 16 wherein the murine antibody is produced by hybridoma cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number ATCC with designation HB-11894 (hybridoma 1A3.3.13) or HB-11895 (hybridoma 5D5.11.6).

18. The antibody of any of claims 15-17 wherein the binding affinity is expressed as a Kd value.

25 19. The antibody of any of claim 15-18 wherein the binding affinity is measured by Biscore or radioimmunoassay.

20. The antibody of claim 1 comprising human κ subgroup 1 consensus framework sequence.

21. The antibody of claim 1 comprising heavy chain human subgroup III consensus framework sequence.

30 22. The antibody of claim 21 wherein the framework sequence comprises a substitution at position 71, 73 and/or 78.

23. The antibody of claim 22 wherein said substitution is R71A, N73T and/or N78A.

35 24. A humanized anti-c-met antibody wherein the humanized antibody inhibits binding human hepatocyte growth factor to its receptor better than a reference antibody comprising a chimeric anti-c-met antibody comprising a light chain and heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10).

118

11/2

25. The antibody of claim 24, wherein the humanized antibody inhibits binding with an IC₅₀ value that is less than half that of the chimeric antibody.
26. The antibody of claim 25, wherein the IC₅₀ is determined across an antibody concentration range from about 0.01 nM to around 1000 nM.
- 5 27. A humanized anti-c-met antibody wherein the humanized antibody inhibits human hepatocyte growth factor (HGF) receptor activation better than a reference antibody comprising a chimeric anti-c-met antibody comprising a light chain and heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10).
28. The antibody of claim 27, wherein the humanized antibody inhibits receptor activation with
10 an IC₅₀ value that is less than half that of the chimeric antibody.
29. The antibody of claim 28, wherein the IC₅₀ is determined across an antibody concentration range from about 0.1 nM to about 100 nM.
30. A humanized anti-c-met antibody wherein the humanized antibody inhibits c-met-dependent cell proliferation better than a reference antibody comprising a chimeric anti-c-met antibody
15 comprising a light chain and heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 7 (SEQ ID NO: 9 and 10).
31. The antibody of claim 30, wherein the humanized antibody inhibits cell proliferation with an IC₅₀ value that is less than half that of the chimeric antibody.
32. The antibody of claim 31, wherein the IC₅₀ is determined across an antibody concentration
20 range from about 0.01 nM to about 100 nM.
33. The antibody of the preceding claims, wherein both the humanized antibody and chimeric antibody are monovalent.
34. The antibody of the preceding claims, wherein both the humanized antibody and chimeric antibody comprise a single Fab region linked to an Fc region.
- 25 35. An antibody comprising a heavy chain variable domain comprising HVR1-HC, HVR2-HC and/or HVR3-HC sequence depicted in Figure 13 (SEQ ID NO: 191-193).
36. The antibody of claim 35, wherein the variable domain comprises FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC and/or FR4-HC sequence depicted in Figure 13 (SEQ ID NO: 187-190).
37. The antibody of claim 35 or 36, wherein the antibody comprises CH1 and/or Fc sequence
30 depicted in Figure 13 (SEQ ID NO: 194 and/or 195).
38. An antibody comprising a light chain variable domain comprising HVR1-LC, HVR2-LC and/or HVR3-LC sequence depicted in Figure 13 (SEQ ID NO: 183-185).
39. The antibody of claim 38, wherein the variable domain comprises FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC and/or FR4-LC sequence depicted in Figure 13 (SEQ ID NO: 179-182).
- 35 40. The antibody of claim 38 or 39, wherein the antibody comprises CL1 sequence depicted in Figure 13 (SEQ ID NO: 186).

41. An antibody comprising a heavy chain variable domain of any of claims 35-37 and a light chain variable domain of any of claims 38-40.
42. The antibody of claims 41, wherein the antibody is monovalent and comprises an Fc region.
43. The antibody of claims 42, wherein the Fc region comprises a first and a second polypeptide,
5 wherein the first and second polypeptide each comprises one or more mutations with respect to wild type human Fc.
44. The antibody of claim 43, wherein the first polypeptide comprises the Fc sequence depicted in Figure 13 (SEQ ID NO: 195) and the second polypeptide comprises the sequence depicted in Figure 14 (SEQ ID NO: 196).
- 10 45. A method of inhibiting c-met activated cell proliferation, said method comprising contacting a cell or tissue with an effective amount of an antibody of any of the preceding claims.
46. A method of modulating a disease associated with dysregulation of the HGF/c-met signaling axis, said method comprising administering to a subject an effective amount of an antibody of any of the preceding claims.
- 15 47. A method of treating a subject having cancer, said method comprising administering to the subject an effective amount of an antibody of any of the preceding claims.
48. The method of claim 47, wherein the cancer is lung cancer, brain cancer, kidney cancer, gastric cancer, colorectal cancer and/or pancreatic cancer.
49. A method of treating a proliferative disorder in a subject, said method comprising
20 administering to the subject an effective amount of an antibody of any of the preceding claims.
50. The method of claim 49, wherein the proliferative disorder is cancer.
51. A nucleic acid encoding the antibody of any of claims 1-44.
52. A host cell comprising the nucleic acid of claim 51.
- 25 53. A composition comprising the antibody of any of claims 1-44.
52. The composition of claim 53, wherein the composition comprises a carrier.

FIG. 1

WO 2006/015371

1117

PCYT/IS3M4M27636

Variable Light Chain

Variable Heavy Chain

Kabat# 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 34 35

huK1 DIQMTQSPSSSLASVGDRTITCRASQ SISKNYLA
muSD5 DIQMTQSPSSSLASVGDRTITCRASQ SISKNYLA
SD5 graft DIQMTQSPSSSLASVGDRTITCRASQ SISKNYLA

Kabat# 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 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75

huK1 YQQKPKGKAPKLLIYAASSLES GVP SR FSGSGTDFLT I
muSD5 YQQKPKGKAPKLLIYAASSLES GVP SR FSGSGTDFLT I
SD5 graft YQQKPKGKAPKLLIYAASSLES GVP SR FSGSGTDFLT I

Kabat# 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

huK1 SSLQPEDFATYYCQQYNLSLPWTF GQG TKVEIKR SEQ ID NO:11
muSD5 SSLQPEDFATYYCQQYNLSLPWTF GQG TKVEIKR SEQ ID NO:9
SD5 graft SSLQPEDFATYYCQQYNLSLPWTF GQG TKVEIKR SEQ ID NO:12

Kabat# 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 34 35 36 37 38 39 40 41 42

huH1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPG
muSD5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPG
SD5 graft EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPG

Kabat# 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82

huH1 KGLEWVSVISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM N
muSD5 KGLEWVSVISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM N
SD5 graft KGLEWVSVISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM N

Kabat# b c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 a 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

huH1 SLRAEDTAVYYCARGF DYWGQGT LVT VSS SEQ ID NO:13
muSD5 SLRAEDTAVYYCARGF DYWGQGT LVT VSS SEQ ID NO:10
SD5 graft SLRAEDTAVYYCARGF DYWGQGT LVT VSS SEQ ID NO:14

Figure 4

WO 2006/015371

4/17

PC/TUS2005/027626

												SDS variants	ka (1/Ms)	k _d (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	W	L	H	W	V	SEQ ID NO.166					
A	S	G	Y	T	F	T	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	F	N	F	D	R	F
W	V	G	M	I	D	P	S	N	S	D	T	R	F	N	F	D	R	F
W	V	G	M	I	D	P	S	N	S	D	T	R	F	N	F	D	R	F
SD ID Nos.168-170																		
H3																		
C	A	R	G	S	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO.171	graft	no detectable binding at 500 nM			
C	A	S	V	S	P	L	D	Y	W	G	SEQ ID NO.172	R94S	5.16E+04	5.07E-04	9.83			
C	A	S	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

124

FIG 5A

I	A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQYFTT	WVRQAPGQGLEWMG
	B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	WVRQAPGQGLEWMG
	C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	WVRQAPGQGLEWMG
	D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	WVRQAPGQGLEWMG
II	A	QVQLQESGPOLVKPSQTLSTCTVSGSV	WI RQPPGKGLEWI Q
	B	QVQLQESGPOLVKPSQTLSTCTVS	WI RQPPGKGLEWI
	C	QVQLQESGPOLVKPSQTLSTCTVS	WI RQPPGKGLEWI
	D	QVQLQESGPOLVKPSQTLSTCTVS	WI RQPPGKGLEWI
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPTFS	WVRQAPGKGLEWVS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	WVRQAPGKGLEWVS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	WVRQAPGKGLEWVS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	WVRQAPGKGLEWVS
	Acceptor		
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	WVRQAPGKGLEWVS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	WVRQAPGKGLEWVS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	WVRQAPGKGLEWVS
	Second Acceptor		
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	WVRQAPGKGLEWVS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	WVRQAPGKGLEWVS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	WVRQAPGKGLEWVS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	WVRQAPGKGLEWVS

FIG 5B

RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 19
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 20
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 21
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 22

RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 23
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 24
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 25
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 26

RFTISRDNSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 27
RFTISRDNSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 28
RFTISRDNSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 29
RFTISRDNSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 30

RFTISDSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 31
RFTISDSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 32
RFTISDSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 33

RFTISDSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 34
RFTISDSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 35
RFTISDSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 36
RFTISDSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT LVTVS S	SEQ ID NO. 37

1 DIQMTQSPSSLSASVQDRVITCF~~251~~WYQQKPGKAPKLLIY~~324~~GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
2 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCF~~252~~WYLQKPGQSPQLLIY~~325~~GVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCF~~253~~WYQQKPGQAPRLLIY~~326~~GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEA
4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC~~254~~WYQQKPGQPPKLLIY~~327~~GVPDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQW

7/17

PCT/US2005/027626

FIG 6A

EDFATYYC[REDACTED]FGQ TKVEIK SEQ ID NO. 38
EDVGVVYYC[REDACTED]FGQGTKEIK SEQ ID NO. 39
EDFAVYYC[REDACTED]FGQGTKEIK SEQ ID NO. 40
EDVAVYYC[REDACTED]FGQGTKEIK SEQ ID NO. 41

FIG 6B

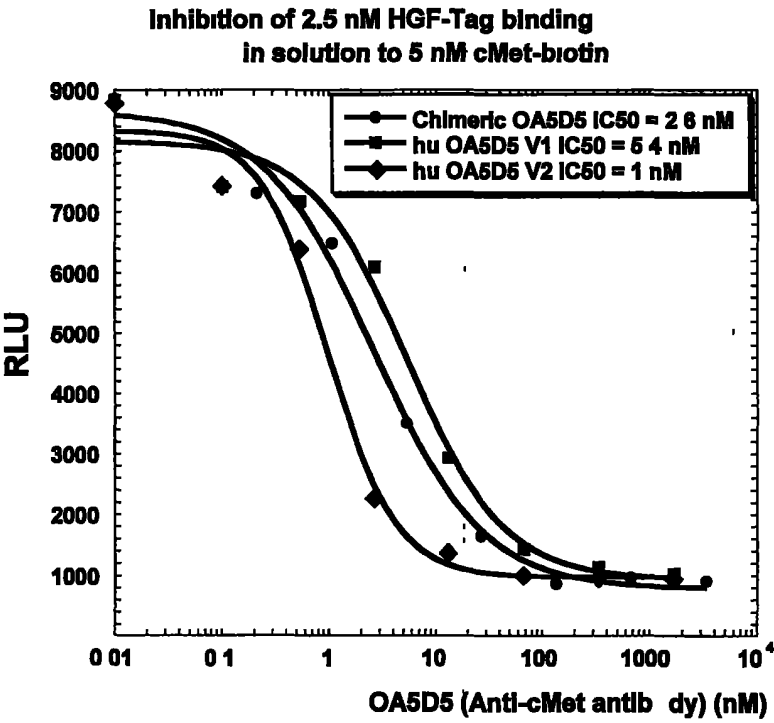
[illegible]

HC																																		
Kabat#	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	
mu5D6	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	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W
	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	63	64	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	83	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	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														
	G	S	Y	V	S	P	L	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO-10)													

FIG 7

FIG._8

Inhibition of HGF/ cMet Binding



~~170~~ 130

Sequence Listing

<110> Genentech, Inc.
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> 196

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

131

<400> 3
Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
5

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

152

<400> 7

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

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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

57 133

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> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<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

134

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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

137

	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> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<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

136

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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

137

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

138

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

139

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 March 2006 (02.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/023889 A3

(51) International Patent Classification:
C07D 257/04 (2006.01) C07D 487/10 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/029879

(22) International Filing Date: 23 August 2005 (23.08.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/603,606 23 August 2004 (23.08.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MIRANDA, Edgar, L. [US/US]; 12 Opalo Chaleis de Santa Clara, 00969 Guaynabo (PR). VLAAR, Cornelis [NL/US]; 209 Calle San Sebastian, 00901 San Juan (PR). ZHU, Jingyang [US/US]; 30 Yorktown Road, Monmouth Junction, NJ 08852 (US).

(74) Agents: GU, Henry, H. et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O.Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,

CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GH, GI, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KM, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

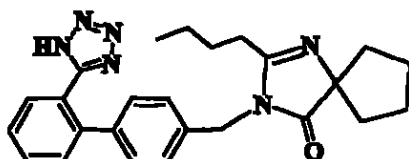
Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
8 September 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: A METHOD FOR PREPARING IRBESARTAN AND INTERMEDIATES THEREOF



(I)

(57) Abstract: A method for preparing irbesartan and intermediates thereof. Irbesartan has the structure of Formula (I).

WO 2006/023889 A3

141

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
05/29879
PCT/US20/05029879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07D 257/04(2006.01),487/19(2006.01) USPC: 548/250, 300.7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 548/250, 300.7 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST; STN CAS ON LINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 7,019,148 B2 (NISNEVICH et al) 28 March 2006 (28.03.2006) entire document	1-25
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 June 2006 (10.06.2006)		Date of mailing of the international search report 25 JUL 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1430 Alexandria, Virginia 22313-1430 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Kamal A. Saad Telephone No. (571) 272 1600

142

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

707

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

1441

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 32

145

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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

<210> 34
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

148

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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

147

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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 38

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

148

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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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

149

	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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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

160 150

<210> 43
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 43
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 44
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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

151

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 49
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 50
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<220>
<221> Xaa
<222> 6
<223> Xaa is A or R

152

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

153

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

154

<223> Sequence is synthesized

<400> 56

Trp Ala Ser Thr Pro Ala Ser
5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 57

Trp Ala Ser Ile Arg Asp Arg
5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 58

Met Pro Asn Thr Arg Asp Ser
5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 59

Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ile
5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 60

Trp Ala Gly Ile Arg Glu Met
5

<210> 61



<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

118

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 69
Trp Thr Ser Asn Arg Val Ser

127
157

5

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

158

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 74

Trp Ala Ser Thr Gly Val Gly
5

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 75

Trp Ser Ser Thr Arg Val Ser
5

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 76

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

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 77

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

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 78

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

159

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 79
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp Leu His
5 10

<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 80
Gly Tyr Pro Phe Thr Thr Arg Trp Leu His
5 10

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

160

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 85
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Trp Leu His
5 10

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 86
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp Leu His
5 10

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 87
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Leu His
5 10

<210> 88
<211> 10

161

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 88
Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Thr Trp Leu His
5 10

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 89
Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Val Trp Leu His
5 10

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 92

162

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Val Trp Leu His
5 10

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 94
Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 95
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 96
Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 97
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

167

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 100

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

Phe Lys Tyr

164

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 104

165

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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

166

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 111

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

Phe Glu Asp

16Y

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

<210> 116
<211> 11
<212> PRT

168 ✓ 168

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 116

Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 117

Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Leu Pro Leu Asp Gln
5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 118

Ser Tyr Arg Ser Tyr Phe Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 119

Ser Tyr Ser Ser Tyr Met Arg Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 120

Ser Tyr Ser Ser Tyr Thr Arg Pro Leu Asp Tyr

169

5

10

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

170

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 125

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

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 126

Thr Tyr His Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 127

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

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 128

Thr Tyr Arg Ser Tyr Lys Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 129

Thr Tyr Arg Ser Tyr Phe Thr Pro Leu Tyr Tyr
5 10

171

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

172

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

<210> 139
<211> 7

173

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 139
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
5.

<210> 140
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 140
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 141
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 142
Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

124 174

<223> Sequence is synthesized

<400> 143

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

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 144

Ser Tyr Arg Ser Tyr Arg Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 145

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 145

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

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 146

Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Val Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 147

Ser Tyr Arg Ser Tyr Val Val Pro Leu Asp Ser
5 10

<210> 148

178 175

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

178

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

<210> 157
<211> 11
<212> PRT

177

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 157

Thr Tyr Arg Ser Tyr Arg Ser Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 158

Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Phe
5 10

<210> 159

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 159

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

<210> 160

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 160

Thr Tyr Ser Ser Tyr Trp Ile Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 161

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 161

Thr Tyr Ser Ser Tyr Val Arg Pro Leu Asp Tyr

178

5

10

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

<210> 166
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial sequence

179

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

180

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Sequence is synthesized

<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> Sequence is synthesized

<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> Sequence is synthesized

<400> 174

Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr Trp Gly

181 181

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 175
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Sequence is synthesized

<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> Sequence is synthesized

<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> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

182

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 182

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

<210> 183

<211> 17

<212> PRT

183

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 184

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
5

<210> 185

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 185

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
5

<210> 186

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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

✓ 184

	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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

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

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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

LYT 185

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 190
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 191
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 191
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
5 10

<210> 192
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 193
Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
5 10

<210> 194
<211> 108
<212> PRT

116

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<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				

187

	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> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 196

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	80	85	90	

187 188

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					

289

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International application No PCT/US2005/027626

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 A61P35/00 C12N15/13 C12N1/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/38557 A1 (GENENTECH, INC; SCHWALL, RALPH, H; TABOR, KELLY, HELEN) 5 December 1996 (1996-12-05) cited in the application the whole document & DATABASE Geneseq [Online] 4 March 1997 (1997-03-04), "Ant1-HGF receptor MAb 5D5 Fab light chain." retrieved from EBI accession no. GSN:AAW07528 Database accession no. AAW07528 ----- -/-	1-54
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 May 2006		Date of mailing of the international search report 30/05/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Luyten, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/027626

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORTON P A ET AL: "IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITY OF FULLY-HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES TO C-MET PROTEIN TYROSINE KINASE" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 44, July 2003 (2003-07), page 1116, XP001194900 ISSN: 0197-016X the whole document	15-19, 24-34, 45-50
X	WO 2004/016769 A (ABGENIX, INC; GUDAS, JEAN, M; HAAK-FRENDSCHO, MARY; FOORD, ORIT; LIANG) 26 February 2004 (2004-02-26) SEQ ID NO: 92 & DATABASE Geneseq [Online] 20 May 2004 (2004-05-20), "Human anti-MCP-1 variable region light chain #23." retrieved from EBI accession no. GSN:ADK52386 Database accession no. ADK52386	38-40
P,X	WO 2005/016382 A (PFIZER PRODUCTS INC; ABGENIX, INC; MICHAUD, NEIL R; KAJIJI, SHAMA; BOR) 24 February 2005 (2005-02-24) examples 1-13	15-19, 24-34, 45-54
P,X	WO 2004/072117 A (PHARMACIA CORPORATION; MORTON, PHILIP, A; ARBUCKLE, J., ALAN; EVANS, M) 26 August 2004 (2004-08-26) examples 1-10	15-19, 24-34, 45,51-54
A	LEE C V ET AL: "High-affinity Human Antibodies from Phage-displayed Synthetic Fab Libraries with a Single Framework Scaffold" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 340, no. 5, 23 July 2004 (2004-07-23), pages 1073-1093, XP004518119 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	1-54

141

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/027626

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 45-50
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 45 (partially) and 46-50 (all completely) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

24/192

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/027626

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9638557	A1	05-12-1996	AU 713862 B2 09-12-1999
			AU 6147196 A 18-12-1996
			CA 2223269 A1 05-12-1996
			EP 0832224 A1 01-04-1998
			IL 118476 A 31-10-2000
			JP 11506327 T 08-06-1999
			US 5686292 A 11-11-1997
			US 6468529 B1 22-10-2002
			US 6207152 B1 27-03-2001
			ZA 9604383 A 01-12-1997
WO 2004016769	A	26-02-2004	AU 2003265575 A1 03-03-2004
			CA 2496419 A1 26-02-2004
			EP 1542724 A2 22-06-2005
			JP 2005536534 T 02-12-2005
WO 2005016382	A	24-02-2005	CA 2534563 A1 24-02-2005
			GB 2404660 A 09-02-2005
			NL 1026776 C2 02-08-2005
			NL 1026776 A1 07-02-2005
WO 2004072117	A	26-08-2004	BR 0407446 A 31-01-2006
			CA 2516236 A1 26-08-2004
			EP 1592713 A2 09-11-2005

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
9 de Febrero de 2006 (09.02.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/015371 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)

(21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/US2005/027626

(22) Fecha de Presentación Internacional:
4 de Agosto de 2005 (04.08.2005)

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Datos de la Prioridad:
60/598,991 5 de Agosto de 2005 (05.08.2005) EU

(71) Solicitante (para todos los estados designados
excepto US): GENENTECH, INC. [EU/EU]; 1 DNA
Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US)

(72) Inventores; a

(75) Inventores/solicitantes (solo para US): DENNIS,
Mark S. [EU/EU]; 120 Plymouth, San Carlos,
California 94070 (EU). BILLECI, Karen [EU/EU];
5247 Shelter Creek Lane, San Bruno, California
94066 (EU). YOUNG, Judy [EU/EU]; 2833
Tramanto Drive, San Carlos, CA, California 94070
(EU). ZHENG, Zhong [EU/EU]; 1175 Balclutha
Drive, Foster City, California 94404 (EU).

(74) Agentes: NAIK, Paul; Genetech, Inc., 1 DNA Way,
South San Francisco, CA 94080-4990 (EU).

(81) Estados Designados (a menos que se indique lo
contrario, para todo tipo de protección nacional

disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo
contrario, para todo tipo de protección regional
disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— con el informe de búsqueda internacional.
— antes de la expiración del tiempo límite para corregir
las reivindicaciones y para ser republicada en el
caso de recibir correcciones

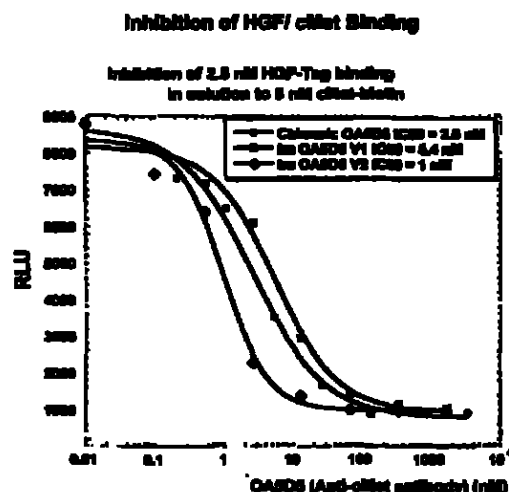
(88) Fecha de Publicación del Reporte de
Búsqueda Internacional
3 de Agosto de 2006

(15) Información sobre la Corrección
Corrección Previa:

Ver Gaceta PCT No. 13/2006 del 30 de Marzo de 2006

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones, referirse a
las "Notas de guía sobre Códigos y Abreviaturas" que
aparecen al comienzo de cada edición de la Gaceta del PCT

(54) Título: ANTAGONISTAS HUMANIZADOS ANTI-CMET



(57) Resumen: La invención dispone anticuerpos terapéuticos anti-c-Met, composiciones que los comprenden y
métodos para emplear estos anticuerpos.

194

ANTAGONISTAS HUMANIZADOS ANTI-CMET

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud es una solicitud no provisional, registrada bajo el 37 CFR 1.53(b)(1), 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 mARN 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; 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

148
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 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,

199

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 K_d 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 K_d 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 K_d para A es $3x$, el valor K_d de M sería $1x$ y la proporción de K_d de A a K_d 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 K_d para C es I_x , el valor K_d de R sería $3x$ y la proporción de K_d de C a K_d 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)

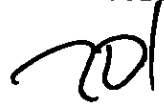
(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QQYYAYPWT (SEQ ID No:3)

(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 GMIDPSNSDTRFNP NFKD (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 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,

20 ✓
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

7/5/03

anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de soporte consensual humano κI 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 κI 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

204

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 κI 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

20

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

206

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,

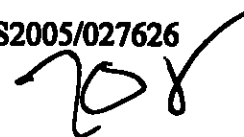
Q), S62(N, D, K, T,V), V63(F,L), K64(E, H, N, D, Q), G65(D, Y, E, H), R94(T,S) y Y102(Q, S, H, F). En una incorporación, un anticuerpo de la invención que comprende la citada modificación R94T o R94S comprende además una o varias modificaciones en la posición 96 y/o 100. En una incorporación, las citadas 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 κ . 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 κ .

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 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

209

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.

20

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

21

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

24 2/2

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 epítotope en una c-met diferente de un epítotope 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-

213
H4

388 de la c-met). En una incorporación, un anticuerpo antagonista de la invención específicamente se fija a un epítipo 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.

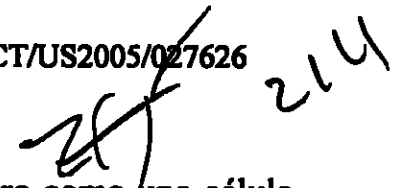
En una incorporación, un anticuerpo de la invención específicamente se fija al aceptor FCH de una primera especie animal y específicamente no se fija al aceptor FCH de una segunda especie animal. En una incorporación, la primera especie animal es humana y/o primate (por ejemplo, el mono de Java) y la 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

215

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 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 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)

220

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 acceptor VH menos Kabat CDRs (SEQ ID No:31)

soporte consensual humano acceptor VH menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:32-33)

soporte consensual humano acceptor VH 2 menos Kabat CDRs (SEQ ID No:34)

soporte consensual humano acceptor 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 acceptor 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 Polymerase 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 predeterminada (de partida) con un residuo de aminoácido diferente. Generalmente y preferiblemente, la modificación resulta en la alteración en por lo menos una actividad fisico-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 fisico-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 [^{125}I]-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 BIAcoreTM-2000 o un BIAcoreTM_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

227 226

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 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 de etanolamina para bloquear los grupos que no reaccionaron. Para las mediciones cinéticas, dos

228/227

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 25 μ l/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 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 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 K_d " 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 (^{125}I)-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 μ g/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 [^{125}I]-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 incubaba 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 K_d o el valor K_d se mide empleando el análisis de resonancia por plasmón de superficie 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 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

230

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 espectómetro, como un espectrofómeto equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofómeto 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 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},

233

/* 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},

/* 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},

234

```

/* 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 */
};

```

```

struct diag {

```

235

```

    int          score;          /* score at last jmp */
    long         offset;         /* offset of prev block */
    short        ijmp;           /* 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 *

29/ 236

- * 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) {
```

237 237

```
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");
fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
fprintf(stderr,"Output is in the file align.out\n");
exit(1);
}
namex[0] = av[1];
namex[1] = av[2];
seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
ofile = "align.out";        /* output file */

nw();                       /* fill in the matrix, get the possible jmps */
readjmpsQ;                  /* get the actual jmps */
print();                    /* print stats, alignment */

cleanup(0);                 /* unlink any tmp files */
}

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
```

244 238

nw()

```

    nw
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int       *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;               /* score for each type */
    int       ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    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 coll", lenl+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DESfSI : PINS1;

    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

```

240 239

```

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[1], yy = 1; yy <= lenl; py++, yy++) {

```

```

    mis = col0[yy-1];

```

```

    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 ongoing del

```

```

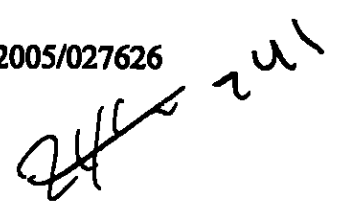
* ignore MAXGAP if weighting endgaps

```

24/240

```
*/
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]++;
}

/* update penalty for del in y seq;
* favor new del over ongong del
*/
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
```



```
        ndelx++;  
    }  
  
    /* pick the maximum score; we're favoring  
    * mis over any del and delx over dely  
    */
```

...RW

```
id = xx - yy + lenl - 1;  
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])  
    collfyy] = 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)) {  
        dx[id].ijmp++;  
        if (++ij >= MAXJMP) {  
            writejumps(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 = len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+insl*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id; }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+insl*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {

```

244 243

```

        smax = coll[yy-1];
        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

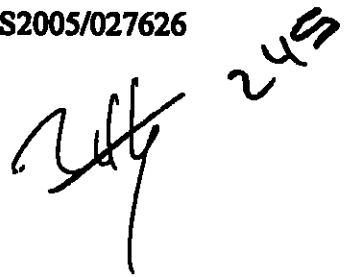
#define PJLINE      256  /* maximum output line */
#define P_SPC 3      /* space between name or num and seq */

extern    _day[26][26];
int .. olen;          /* set output line length */
FILE *fx;             /* output file */

```

244
print

```
print ()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */
    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}
```



}

/*

*trace back the best path, count matches

*/

static**getmat**(lx, ly, firstgap, lastgap)**getmat****int** lx, ly; /* "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 = seqxf[l] + pp[0].spc;

n0 = pp[l].spc + 1;

n1 = pp[0].spc + 1;

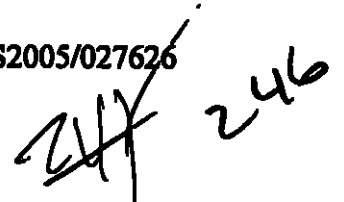
nm = 0;

while (*p0 && *p1) {**if** (siz()) {

pl++;

nl++;

siz0--;



```

    }
    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[1].x[i1])
            sizl = pp[1].n[i1++]; p0++; pl++;
    }
}

/*pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent
similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
...getmat

```

247

```

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);
    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      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line
*/

```

249 248

```

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[]
 */

static
pr_align()                                pr_
align
{
    int      nn;          /*char count*/
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[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++) {
            /*

```

~~258~~ 249

```
* 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]])
```

250

```

        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
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();

```

252 251

```

        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;

    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)

putline

```

    int ix;
    {

```

...putline

```

        int i;
        register char *px;

```

```

        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

```

```

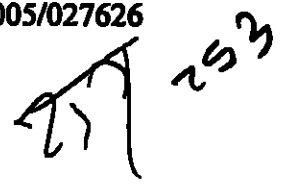
 */

```

```

        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[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    stars
    {
        int i;
        register char *p0, *p1, ex, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == " && *(po[0]) == ' ')) ||
            !*out[1] || (*out[1] == " && *(po[1]) == ' '))
            return;

        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
            *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
            if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                    cx = '*';
                    nm++;
                }
                else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                    cx = '.';
                else
                    cx = " ";
            }
        }
    }
}

```

24/254

```

        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 == V)

```

```

            py = px + 1;

```

```

    if (py)

```

```

        (void) strcpy(pn, py);

```

```

    return(strlen(pn));

```

}

/*

* 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

255

* writejumps() — write a filled array of jumps to a tmp file: nw()

*/ ...

#include "nw.h"

#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXXXX"; /* 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)

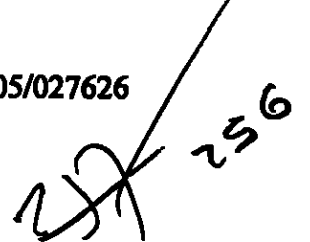
getseq

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] = pseq[1] = 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++) {
```

24/257

```
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        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);
}
```

24258

/*

* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()

*/

readjumps()

readjumps

{

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(1);

}

}

for (i = i0 = il = 0, dmax() = dmax, xx = len(); ; i++) { **while** (1) { **for** (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx;

j--);

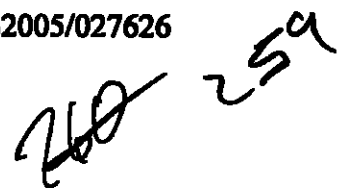
...readjumps

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;

}

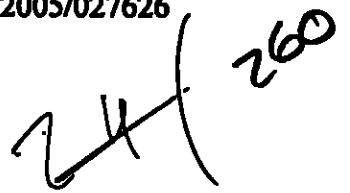
else **break**;



```

    }
    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;
        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 < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].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(1);
        }
    }
}

```

```
    }  
    if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {  
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);  
        exit(1);  
    }  
}  
  
(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)NR.sub.2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH.sub.2("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

265

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 o 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

26/168

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-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (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-GVPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:48)-L3-FGQG TKVEIK (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.

270

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 blastocoélicos; 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.

271

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-TM1); 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 gammaII y calicheamicina omegaII (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, idarabicina, 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-mercaptapurina, 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 folínico; aceglatona; aldofosfamida 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"-triclorotrietilamina; 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

275

275
paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucil; 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 leucovovina.

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, LY17018, 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 tripterelina; 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 megesterol, 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-dioxolán 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 aceptor 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 I; ABARELIX® rmRH; lapatinib ditosilato (un ErbB-2 y EGFR inhibidor dual de molécula pequeña de la 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-Iixo-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, Khazzaeli 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. (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:

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 WVRQAPGKGLEWV (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 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (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);

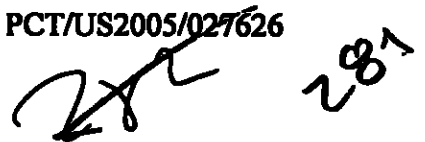
soporte consensual subgrupo II kappa humano VL(SEQ ID NO:39);
soporte consensual humano VL kappa subgrupo III (SEQ ID NO:40); o
soporte consensual subgrupo IV kappa humano VL(SEQ ID No:41).

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 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35 (H1), 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 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 ineffectividad 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 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)

283

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

27 28b

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

287

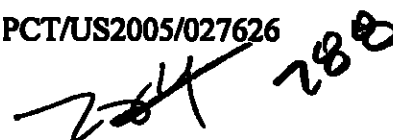
vectores están disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula anfitriona que se va a emplear. Generalmente, las células anfitrionas preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente mamífero).

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 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, Ipp, o líderes enterotoxina II estables en el calor (STII), LamB, PhoE, PeIB, 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

ZCH

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 disulfidas, 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 Iq 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 ditiotreitrol.

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 eletroforesis 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 OD₅₅₀ 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 Nò. 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 inmunoafinidad 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

2a

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 polipéptido de esta invención mediante unas eucariotas más altas, con frecuencia se aumenta al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas 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 polioma 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

301 300

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 CV1 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 (CV1 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

302

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 isótopos 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 levigado a un pH entre alrededor de 2.5-4.5, preferiblemente

efectuado 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 monolitos 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

308 305

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.

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

306

papel que juegan los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata. Es decir, analizar los residuos que influyen en 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 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

308 308

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
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)):

310 309

- (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 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 empaquetado 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 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

311
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.

Inmunconjugados

La invención igualmente se relaciona con inmunconjugados, 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. 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,

312
243
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 ¹¹¹In o ⁹⁰Y fijado por un quelante de unión de tioúrea (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

34/ 313
fracción de fármaco maitansinoide, DM1, 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 *Phytolaca 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

314 314

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

315

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 (inmunoconjugados)

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-1-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_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ^1 (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 *Phytolaca 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,

244 318

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

210 319

puede preparar una inmunotoxina de 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 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

34 320

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 (ditiotreitól). 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-

321

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,

323 322

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 propopilenglicol, 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 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,

72f 323
glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, mannososa, o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales como sodio, complejos metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONIC™ 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-(metilmetacrilato) 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-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables ácido láctico ácido glicólico como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables

22/ 324

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-CD11, 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

32/326

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 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

22A 327

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 $\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ejemplo 0.1 mg/kg -10 mg/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 $\mu\text{g/kg}$ 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 10 mg/kg . Por lo tanto, una o varias dosis de alrededor de 0.5 mg/kg , 2.0 mg/kg , 4.0 mg/kg o 10 mg/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.

330

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 (huIII) 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

225 331

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.

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 µl conteniendo 660 ng de oligonucleótido, 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 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 µg de molécula patrón Kunkel en 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂ en un volumen final de 500 µl 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 µl de la mezcla hibridada se agregaron 150 µl de PB y la mezcla se dividió en dos columnas de sílice. Después de lavar cada columna con 750 µl de PE y de una agitación adicional para secar las columnas, cada columna se levigó con 110 µl de 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8. Luego la molécula patrón hibridada y limpia (220 µl) se completó al agregar 1 µl 100mM ATP, 10 µl 25mM dNTPs (25mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 15 µl 100mM DTT, 25 µl 10X TM solución amortiguadora (0.5 M Tris pH 7.5, 0.1 M MgCl₂), 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 x 10⁹ 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

33/ 333

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 XL1 (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

251 334

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 I 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 ul 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

32/ 336

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 linfoide 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 estreptomycin, 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 celdas 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 estreptomycin, 2 mM L-

22/ 337

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 transinfectadas (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 InM 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 fosfamidatasa (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

23/1 338

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 acceptor 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 acceptor 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 inmovilizado, 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 inmovilizado 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.v1) 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

340 339

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.vl; 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.v1). Cuando se efectuaron pruebas en un rango de concentración

342 341

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.v1. Notablemente, OA-5D5.v1 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.v1. 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

342

247
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.

344 343

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.

342 344

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*.

345

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

346

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

347

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.

348

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.

340 349

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 Shc 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.

25/ 350

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.

932351

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.

Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 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.

37352

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

354

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 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 Kd.
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 R71A, 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 IC50 que es menos de la mitad del que corresponde al anticuerpo quimérico.

355

26. El anticuerpo de la reivindicación 25, donde el IC50 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 human (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 IC50 que es menos de la mitad del que corresponde al anticuerpo quimérico.
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.

356

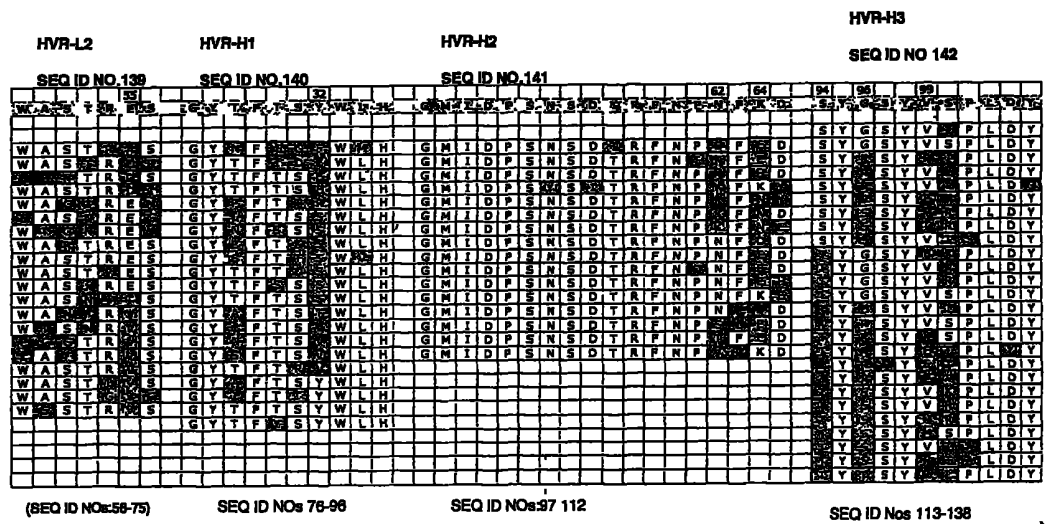
35. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC representada en la Figura 13 (SEQ ID No: 191-193).
36. El anticuerpo de la reivindicación 35, donde el dominio variable comprende una secuencia FR1-HC, FR2-HC, FR3- HC y/o FR4-HC 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.
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.

05/02/2026

Figura 2



7117

PC1115370651077676

吃

24

[illegible]

Figure 4

WO 2006/015371

4/17

PCT/US2005/017634

										SDS Variantes	ka (1/Ms)	kD (1/s)	KD (nM)		
L2															
I	Y	W	A	S	T	R	S	G	V	SEQ ID NO 164					
I	Y	W	A	S	T	R	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	W	L	W V SEQ ID NO 166					
A	S	G	Y	T	F	T	S	W	L	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 F N F D R F	#4	6 30E+04	4 92E-04	7 81	
W	V	G	M	I	D	P	S	N	S	D T R F N P N F D R F	#12	5 98E+04	5 06E-04	8 46	
SQ ID Nos 168-170															
H3															
C	A	R	E	G	S	Y	V	S	P	L D Y W G	SEQ ID NO 171	injerto	no se detecta unión a	500 nM	
C	A	R	E	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	E	G	S	Y	V	S	P	L D Y W G	SEQ ID NO 173	OA-5D5	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

26

FIG 5A

WFO 2006/015371

I
A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTWVRQAPGQGLEWMG
B QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASWVRQAPGQGLEWM
C QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASWVRQAPGQGLEWM
D QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASWVRQAPGQGLEWM

II
A QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS GGSYSWVRQAPGKGLEWIG
B QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSWVRQAPGKGLEWIG
C QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSWVRQAPGKGLEWIG
D QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSWVRQAPGKGLEWIG

III
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWVRQAPGKGLEWVS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASWVRQAPGKGLEWVS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASWVRQAPGKGLEWVS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASWVRQAPGKGLEWVS

Aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKWVRQAPGKGLEWVS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASWVRQAPGKGLEWVS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASWVRQAPGKGLEWVS

Segundo Aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKWVRQAPGKOLEWVS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASWVRQAPGKGLEWVS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASWVRQAPGKGLEWVS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASWVRQAPGKGLEWVS

4/17

PC1/US2005/027636

Handwritten signature

RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 19
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 20
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 21
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 22
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 23
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 24
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 25
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 26
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 27
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 28
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 29
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 30
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 31
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 32
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 33
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 34
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 35
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 36
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO. 37

WO 2006/014371

6/17

PCT/US2004/027626

WO 2006/015371

11 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC[REDACTED]WYQQKPGKAPKLLIY[REDACTED]GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP

12 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISG[REDACTED]WYLQKPGQSPQLLIY[REDACTED]GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE[REDACTED]

13 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC[REDACTED]WYQQKPGQAPRLLIY[REDACTED]GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE[REDACTED]

14 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC[REDACTED]WYQQKPGQPPKLLIY[REDACTED]GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ[REDACTED]

7/17

FIG 6A

PC1/US2005/027636

3/3

EDFATYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO. 38
EDVGVYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO. 39
EDFAVYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO. 40
EDVAVYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO. 41

WO 2006/015371

M/17

PCT/US2005/027636

[Handwritten signature]

FIG 6B

9/17

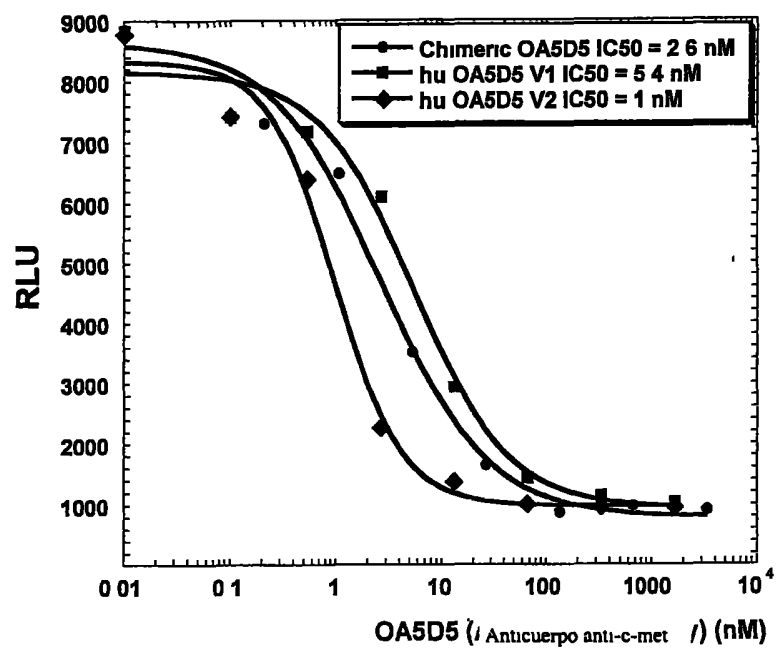
PCT/US2005/027626

[Handwritten signature]

FIG 7

FIG._8

Inhibición de HGF/ Punto de Union de cMET
Inhibición de la fijación de 2.5 nM HGF-marcaador
en solución a 5 nM de biotina con cMet



Handwritten signature

Listado de Secuencias

369 368

- <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

370 369

<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

371 370

<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

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

```

37 372

<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

341 373

				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

374

<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

375

<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

279 376

<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

378
377

<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>

374
378

<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

~~310~~
379

<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

38/300

<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

381

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

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	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

387 382

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

364 383

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

384

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

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

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

385

	20		25		30								
Gln	Ala	Pro	Arg	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
	50								55				60
Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gly	Gln	Gly
	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

3A 386

<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

387 387

<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

389 388

<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

340 389

<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>

39/ 340

<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

391 391

<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

347 392

<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

396 393

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

394

<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

796 395

<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

396 396

<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

398 397

<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

309 398

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

~~400~~ 399

<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

400/400

<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

401

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

407 402

<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

404 403

<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

~~465~~ 404

<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

406
405

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

407 406

<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

407 407

<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

408 408

<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

412 409

<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>

44/ 410

<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

411

<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

4/7 412

<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

CHA u13

<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

4/14

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

415

<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>

CH 416

<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
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

4/18 417

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

419 418

<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

42D 4A

<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

42/420

	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

422
421

<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

427 412

<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

424 423

	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	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	80	85	90	

425
424

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						

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
GENENTECH, INC.
Attn. Naik, Paul
1 DNA Way
MS49
South San Francisco, CA 94080-4990
UNITED STATES OF AMERICA

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
 THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
 THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
 SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference P2138R1	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2005/027626	International filing date (day/month/year) 04/08/2005
Applicant GENENTECH, INC.	Due Date 30 AUG 06

- ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.
 Filing of amendments and statement under Article 19:
 The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 48):
 When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.
 Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 94 chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.92.70
 For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.
- ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(e) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
- ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
 - ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
 - ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.
- Reminders**
 Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 80bis.1 and 80bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.
 The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.
 Within 18 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.
 In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 18 months.
 See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 spo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Henriette Huysing-Solles
--	---

427 426

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the international Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purpose of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the international Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 298).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the international Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the international Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the international Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 48.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the international Bureau and not with the receiving Office or the international Searching Authority (Rule 48.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREA. /

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P2138R1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/027626	International filing date (day/month/year) 04/08/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 05/08/2004
Applicant GENENTECH, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:



the international application in the language in which it was filed



a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established, according to Rule 55.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 8



as suggested by the applicant



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

428 428

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DB2005/027626

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in electronic form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

429

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2005/027626

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

Therapeutic anti-c-met antibodies, and compositions comprising and methods of using these antibodies.

43/ 430

		International application No PCT/US2005/027626
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 A61P35/00 C12N15/13 C12N1/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/38557 A1 (GENENTECH, INC; SCHMALL, RALPH, H; TABOR, KELLY, HELEN) 5 December 1996 (1996-12-05) cited in the application the whole document & DATABASE Geneseq [Online] 4 March 1997 (1997-03-04), "Anti-HGF receptor MAb 5D5 Fab light chain." retrieved from EBI accession no. GSN:AAW07528 Database accession no. AAW07528 -/--	1-54
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underlain the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 May 2006		Date of mailing of the international search report 30/05/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentien 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Luyten, K

432 431

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No PCT/US2005/027626
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORTON P A ET AL: "IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITY OF FULLY-HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES TO C-MET PROTEIN TYROSINE KINASE" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 44, July 2003 (2003-07), page 1116, XP001194900 ISSN: 0197-016X the whole document	15-19, 24-34, 45-50
X	WO 2004/016769 A (ABGENIX, INC; GUDAS, JEAN, M; HAAK-FRENDSCHO, MARY; FOORD, ORIT; LIANG) 26 February 2004 (2004-02-26) SEQ ID NO: 92 & DATABASE Geneseq [Online] 20 May 2004 (2004-05-20), "Human anti-MCP-1 variable region light chain #23." retrieved from EBI accession no. GSN:ADK52386 Database accession no. ADK52386	38-40
P,X	WO 2005/016382 A (PFIZER PRODUCTS INC; ABGENIX, INC; MICHAUD, NEIL R; KAJIJI, SHAMA; BOR) 24 February 2005 (2005-02-24) examples 1-13	15-19, 24-34, 45-54
P,X	WO 2004/072117 A (PHARMACIA CORPORATION; MORTON, PHILIP, A; ARBUCKLE, J., ALAN; EVANS, M) 26 August 2004 (2004-08-26) examples 1-10	15-19, 24-34, 45,51-54
A	LEE C V ET AL: "High-affinity Human Antibodies from Phage-displayed Synthetic Fab Libraries with a Single Framework Scaffold" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 340, no. 5, 23 July 2004 (2004-07-23), pages 1073-1093, XP004518119 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 45-50
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 45 (partially) and 46-50 (all completely) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

433

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No
PCT/US2005/027626

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9638557	A1	05-12-1996	AU 713862 B2 09-12-1999
		AU 6147196 A	18-12-1996
		CA 2223269 A1	05-12-1996
		EP 0832224 A1	01-04-1998
		IL 118476 A	31-10-2000
		JP 11506327 T	08-06-1999
		US 5686292 A	11-11-1997
		US 6468529 B1	22-10-2002
		US 6207152 B1	27-03-2001
		ZA 9604383 A	01-12-1997
WO 2004016769	A	26-02-2004	AU 2003265575 A1 03-03-2004
		CA 2496419 A1	26-02-2004
		EP 1542724 A2	22-06-2005
		JP 2005536534 T	02-12-2005
WO 2005016382	A	24-02-2005	CA 2534563 A1 24-02-2005
		GB 2404660 A	09-02-2005
		NL 1026776 C2	02-08-2005
		NL 1026776 A1	07-02-2005
WO 2004072117	A	26-08-2004	BR 0407446 A 31-01-2006
		CA 2516236 A1	26-08-2004
		EP 1592713 A2	09-11-2005

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

To:

see form PCT/ISA/220

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2005/027828

International filing date (day/month/year)
04.08.2005

Priority date (day/month/year)
05.08.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 A61P35/00 C12N15/13 C12N1/21

Applicant
GENENTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Luyten, K

Telephone No. +31 70 340-8824



436 435

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/027626

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ on paper
- ☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☐ contained in the international application as filed.
- ☐ filed together with the international application in electronic form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

436

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/027626

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 1-34 (all partially); 45 (partially) and 46-50 (all completely) with respect to industrial applicability because:
 - ☒ the said international application, or the said claims Nos. 45 (partially) and 46-50 (all completely) with respect to industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):
see separate sheet
 - ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 1-34 (all partially) are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
see separate sheet
 - ☒ the claims, or said claims Nos. 1-34 (all partially) are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
see separate sheet
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

438 437

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/027626

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-14, 20-23, 36-37, 42-44 and 48
	No: Claims	15-19, 24-35, 38-41, 45-47 and 49-54
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-54
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-44, 51-54
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

439 438

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/027626

SECTION III

- 1 The antibodies of claims 1-14 and 20-23 are defined by comprising "at least one variant HVR, wherein the variant HVR comprises modification of at least one residue", therefore claims 1-14 and 20-23 relate to an extremely large number of possible antibodies. However, the description does provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for only a very small proportion of the antibodies claimed (Examples and Figure 4; see also Section VIII 1.1-1.2).

Claims 15-19 and 24-34 relate to a humanized anti-c-met antibody which has a given desired property or effect. Support and disclosure is given for only a few antibodies having said property or effect and it is not known to the person skilled in the art which humanized anti-c-met antibodies will have said properties (see Section VIII, 1.3).

The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search of claims 1-34 was restricted to the specifically disclosed 5D5 variants which have a higher affinity than the monovalent affinity of murine 5D5 (8.3 nM; description page 97, last line; Figure 4), i.e. the 5D5 variants #92, #78 (=rhuOA-5D5.v2), #75 and #95 (the search was done based on the sequence information available for these variants).

- 2 Claims 45 (partially, as far as an in vivo method is concerned) and 46-50 (all completely) relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

SECTION V

1 PRIOR ART

1.1 Reference is made to the following documents:

D1: WO 96/38557 A1 (GENENTECH, INC; Schwall, Ralph, H; Tabor, Kelly, Helen)

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/027626

5 December 1996 (1996-12-05) cited in the application

- D2: Morton P A et al: "In vitro and in vivo activity of fully-human monoclonal antibodies to c-met protein tyrosine kinase" Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, New York, NY, US, vol. 44, July 2003 (2003-07), page 1116, XP001194900 ISSN: 0197-016X
- D3: WO 2004/016769 A (ABGENIX, INC; Gudas, Jean, M; Haak-Frendscho, Mary; Foord, Orit; Liang) 26 February 2004 (2004-02-26)
- D4: LEE C V et al: "High-affinity Human Antibodies from Phage-displayed Synthetic Fab Libraries with a Single Framework Scaffold" Journal of Molecular Biology, London, GB, vol. 340, no. 5, 23 July 2004 (2004-07-23), pages 1073-1093, XP004518119 ISSN: 0022-2836 cited in the application

- 1.2 Document D1 discloses the production and characterization of the murine anti-c-met antibody 5D5, and the DNA cloning, sequencing, expression (*E. coli*) and characterization of the 5D5 Fab (Examples 1-2 and 10-15). SEQ ID NO: 1-6, 183-185 and 191-192 of the present application are 100% identical to the HVRs of 5D5. D1 also discloses a method of inhibiting c-met activated cell proliferation, wherein BaF3 cells expressing human c-met are contacted with the 5D5 Fab and block cell proliferation in the presence of HGF (hepatocyte growth factor) (Example 9A). D1 suggests and claims the use of an c-met (HGF receptor) antagonist, e.g. an antibody, for treating cancer (whole document).
- 1.3 Document D2 discloses human anti-c-met antibodies (scFvs) that inhibit binding of hepatocyte growth factor to c-met with an IC50 of less than 50 nM. D2 also discloses fully-human anti-c-met IgG1 with an affinity for c-met in the range of 0.8 to 55 nM measured using a BIAcore assay. These antibodies compete with HGF for c-met binding at 0.45-2.9 mM. The anti-c-met IgGs of D2 stimulate c-met activity, and only inhibit c-met dependent cell proliferation at concentrations higher than 100 nM. D2 furthermore suggests the use of affinity-matured monovalent versions of fully-human c-met IgG to modulate c-met activity in human cancers (whole document).
- 1.4 Document D3 discloses an anti-MCP-1 antibody comprising a light chain variable domain, which comprises HVR2-LC/SEQ ID NO: 184, FR4-LC/SEQ ID NO: 182, and the CL1 sequence according to SEQ ID NO: 186 of the present application (D3, SEQ

440

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/027626

ID NO: 92).

- 1.5 Document D4 discloses a method for the affinity maturation of human antibodies by using HVR (CDR) diversity libraries. This approach was used to select an anti-mVEGF antibody with sub-nanomolar affinity (0.016 nM) (whole document).

2 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

- 2.1 The anti-c-met antibody of D1 contains the six HVRs according to SEQ ID NO: 1 to 6, but does not contain a variant HVR. Therefore, claim 1 is novel over D1. No other document appears to disclose an anti-c-met antibody with a variant HVR-H3 according to the SEQ ID NO: 175 to 178 (5D5 variants #92, #78, #75 and #95). Thus, claims 1-14 and 20-23 appear, to be novel. Though, note that claim 1 has been searched only partially due to lack of clarity and support (see Sections III and VIII).

- 2.2 The humanized anti-c-met antibodies of independent claims 15, 16, 24, 27 and 30 are defined by the result to be achieved, whereby the desired functions, "monovalent affinity for human c-met", "inhibits binding human hepatocyte growth factor to its receptor", "inhibits human hepatocyte growth factor (HGF) receptor activation", or "inhibits c-met-dependent cell proliferation" are compared to a reference antibody. The human anti-c-met scFvs and IgGs of document D2 have not been tested in comparison with the same reference antibody as in the application, however, it appears that their affinity for human c-met and binding inhibition (IC50) fall within the same range as for the antibodies of the examples and the antibodies as claimed. Therefore, claims 15-19, 24-26 and 33-34 are not novel over D2. Although, the anti-c-met IgGs of D2 stimulate c-met activity, and only inhibit cell proliferation at concentrations higher than 100 nM, no data are provided in D2 with respect to the anti-c-met scFvs and their effect on c-met activation and c-met dependent cell proliferation. But, the anti-c-met scFvs might have the functional features of the antibodies of claims 27-32, and therefore D2 also anticipates the novelty of claims 27-32.

- 2.3 The 5D5 antibody of document D1 comprises a heavy chain variable domain comprising HVR1-HC and HVR2-HC (SEQ ID NO: 191 and 192) and a light chain

442
441

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/027626

variable domain comprising HVR1-LC, HVR2-LC and HVR3-LC (SEQ ID NO: 183-185). Therefore, D1 anticipates the novelty of claims 35, 38 and 41. D1 does not comprise any of the framework (FR) or constant regions (CH1, Fc) of claims 36 and 37, therefore claims 36 and 37 appear to be novel over D1. The 5D5 antibodies of D1 are either monovalent (Fab) or comprise an Fc region (IgG1/Kappa), but D1 does not disclose an 5D5 antibody that is both monovalent and comprises an Fc region. Therefore, claims 42-44 are novel over D1. D1 also disclose the nucleic acid encoding a 5D5 antibody, a host cell carrying said nucleic acid and compositions containing a 5D5 antibody. Thus, claims 51-53 are not novel over D1. Since, the term "carrier" is very broad and also covers a buffer, D1 also anticipates the novelty of claim 54.

- 2.4 The anti-MCP-1 antibody of document D3 comprises a light chain variable domain, which comprises HVR2-LC/SEQ ID NO: 184, FR4-LC/SEQ ID NO: 182 and the CL1 sequence according to SEQ ID NO: 186, therefore D3 anticipates the novelty of claims 38-40.
- 2.5 The method of inhibiting c-met activated cell proliferation using the anti-c-met 5D5 Fab as in D1, anticipates the novelty of claim 45.
- 2.6 Due to the broad definition of the disease (disease associated with dysregulation of the HGF/c-met signaling axis (claim 46); proliferative disorder (claim 49)) and/or the antibodies, the use of an anti-c-met antibody as in documents D1 and D2 for treating cancer, anticipates the novelty of claims 46-47 and 49-50. Though, neither D1 nor D2 disclose the use of an anti-c-met antibody for treating lung cancer, brain cancer, kidney cancer, gastric cancer, colorectal cancer and/or pancreatic cancer. Therefore, claim 48 appears to be novel over D1 and D2.
- 2.7 Thus, claims 1-14, 20-23, 36-37, 42-44 and 48 appear to be novel. Though, the present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 15-19, 24-35, 38-41, 45-47 and 49-54 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

3 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

447 442

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/027626

3.1 Document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claims 1-14, 20-23, 36-37, 42-44 and 48.

3.2 Said claims differ from document D1 in that the sequence of the (anti-c-met) antibody is different (claims 1, 36-37, 42-44) or that the cancer to be treated is lung cancer, brain cancer, kidney cancer, gastric cancer, colorectal cancer or pancreatic cancer (claim 48). The effect of these differences is not known. The problems to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing an alternative anti-c-met antibody (claim 1), providing an alternative antibody (claims 36-37, 42-44) or selecting a cancer to be treated with an antibody (claim 48).

3.3 The solutions as in claims 1, 36-37 and 42-44 are not solving the problem posed, since the antigen-binding domain of the antibodies is not fully defined. Only antibodies of which the full heavy and light chain variable regions are defined can be considered to have the characteristics and properties of the antibodies exemplified in the application (see also Section VIII, 1.1-1.2). For the same reasons claims 2-14, 20-23 are not solving the problems posed.

3.4 The solution as in claim 48 is also not solving the problem posed, since there is no support in the description for the medical use of the broad range of antibodies of claim 48.

3.5 If a new independent claim would be provided that is limited to fully-defined antibodies with support in the description, i.e. humanized anti-c-met antibodies comprising a light chain variable domain and a heavy chain variable domain of one of the following 5D5 variants: #92, #78, #75 or #95 (see Figure 4), whereby the antibodies are defined by the full sequence of both the heavy and light chain variable domains by means of the relevant SEQ ID NOs, an inventive step would still be missing for the following reason:

Said claim would differ from document D1 in that the anti-c-met antibody contains a human framework and that the HVR-H3 differs in sequence. The effect of the different HVR-H3 sequence is that said antibodies have a higher affinity than the

444 443

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/027626

murine 5D5 of D1. The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing a humanized anti-c-met antibody with a higher affinity than the murine 5D5 (8.3 nM). D2 already discloses human anti-c-met antibodies with an affinity of 0.8 nM. Moreover, methods for affinity maturation of antibodies are known to the person skilled in the art. For example in document D4 picomolar affinities, 0.016 nM, were obtained for an anti-mVEGF Fab. Thus, it would be a routine procedure for the person skilled in the art to produce, starting from the murine 5D5, a humanized anti-c-met antibody with a higher affinity than 5D5. Therefore, said antibodies do not involve an inventive step.

Though, if the antibodies of the present application would show a surprising effect in vivo, i.e. if they would be more efficient in an in vivo pancreatic tumor model than the murine 5D5, then the antibodies and the use of said antibodies for preparing a medicament would be inventive. However, the present application lacks comparative experimental data to support a surprising effect.

- 3.6 In view of the above, the present application does not meet the requirements of Article 52(1) EPC, because the subject-matter of claims 1-14, 20-23, 36-37, 42-44 and 48 does not involve an inventive step in the sense of Article 56 EPC.

4 INDUSTRIAL APPLICABILITY (Art. 33(4) PCT)

- 4.1 For the assessment of the present claims 45-50 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

SECTION VI

WO 2005/016382 A (PFIZER PRODUCTS INC; ABGENIX, INC; Michaud, Neil R; Kajiji, Shama; Bor), 24 February 2005 (2005-02-24), Filing date: 4 August 2004,

444/444

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/027626

Priority date: 4 August 2003.

WO 2004/072117 A (PHARMACIA CORPORATION; Morton, Philip, A; Arbuckle, J.,
Alan; Evans, M), 26 August 2004 (2004-08-26), Filing date: 11 February 2004,
Priority date: 13 February 2003.

444 445

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/027626

SECTION VIII

1 CLARITY AND SUPPORT (Art. 6 PCT)

- 1.1** An antibody is structurally made of two light and two heavy chains and the combination of the heavy and light chain variable regions confers the antigen-binding properties. As is shown in the present examples, changing just one amino acid residue in either one of the HVRs or in one of the framework sequences can drastically change the antigen-binding affinity or even abolish binding of the antibody. Therefore, to define an antibody by structural features, the sequence of the full heavy and light chain variable regions of the antibody should be specified. However, in claims 1-14, 20-23 and 35-44 the variable regions are only partially defined. Therefore the antibodies are not clearly defined and claims 1-14, 20-23 and 35-44 do not meet the requirements of Article 6 PCT.
- 1.2** Claims 1-14, 20-23 and 35-44 are not only unclear, they are also very broad due to the different possible variations as a result of expressions like e.g. "at least one HVR", "at least one variant HVR", "modifications of at least one residue", "at least a portion", "substitutions in any combination of the following positions", "variable domain comprising HVR1, HVR2, and/or HVR3" and "comprises one or more mutations". However, the antigen-binding properties of all these possible antibodies are not disclosed, affinity data are only provided for selected clones (see Figure 4). Therefore, claims 1-14, 20-23 and 35-44 lack support. Also claims 50-54 related to a nucleic acid, host cell or composition comprising an antibody of any of said claims are not supported.
- 1.3** Claims 15-19 and 24-34 do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, "wherein monovalent affinity of the antibody to human c-met is substantially the same as/at least 3-fold greater than monovalent affinity of a reference antibody", "inhibits binding human hepatocyte growth factor to its receptor better than a reference antibody", "inhibits human hepatocyte growth factor (HGF) receptor activation better than a reference antibody", or "inhibits c-met-dependent cell proliferation better than a reference

44/46

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/027626

antibody" wherein the reference antibody comprises a light and heavy chain variable sequence according SEQ ID NO: 9 and 10. This merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result. Therefore, said claims lack clarity and support.

- 1.4 Claims 45-49 are not supported by the description as required by Article 6 PCT, as their scope is broader than justified by the description and drawings. The reasons therefore are the following: the description only provides support for a method of inhibiting c-met activated cell proliferation, comprising contacting a cell with antibody rhuOA-5D5.v2 (claim 45) and the use of antibody rhuOA-5D5.v2 for treating pancreatic cancer (claims 46-49).
- 1.5 In the medical use claims 46 and 49 the therapeutic application is functionally defined by a mechanism of action (disease associated with dysregulation of the HGF/c-met signaling axis; proliferative disorder) which does not allow any practical application in the form of a defined, real treatment of a pathological condition (disease). Therefore, said claims are unclear.
- 1.6 Claims 15-16, 24, 27, 30, 35-40 and 44 do not meet the requirements of Rule 6.2(a) PCT, since they contain references to the Figures, There is no reason to refer to the Figures, since the technical features can be defined by the SEQ ID NOs.
- 1.7 Since it is unclear whether features within parentheses in the claims are limiting or not, the use of brackets in the claims should be avoided.
- 1.8 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT, because claims 1-54 are not clear and/or lack support.

447
447

P2138R1

1/4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.173)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P2138R1
I	Title of invention	HUMANIZED ANTI-CMET ANTAGONISTS
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	GENENTECH, INC.
II-5	Address	1 DNA Way South San Francisco, California 94080-4990 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	1-650-225-1000
II-9	Facsimile No.	1-650-952-9881
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	DENNIS, Mark S.
III-1-5	Address	120 Plymouth San Carlos, California 94070 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

P2138R1

2/4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or Inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	BILLECI, Karen
III-2-5	Address	5247 Shelter Creek Lane San Bruno, California 94066 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or Inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	YOUNG, Judy
III-3-5	Address	2833 Tramanto Drive San Carlos, CA, California 94070 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
III-4	Applicant and/or Inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	ZHENG, Zhong
III-4-5	Address	1175 Balclutha Drive Foster City, California 94404 United States of America
III-4-6	State of nationality	US
III-4-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	NAIK, Paul
IV-1-2	Address	Genentech, Inc. MS 49 1 DNA Way South San Francisco, California 94080 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	650-225-5530
IV-1-4	Facsimile No.	650-952-9881

P2138R1

3/4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

V	DESIGNATIONS		
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.		
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	05 August 2004 (05.08.2004)	
VI-1-2	Number	60/598,991	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VI-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	106	-
IX-3	Claims	4	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	17	-
IX-7	TOTAL	132	

452
449

P2138R1

4/4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	8	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	NAIK, Paul	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

CF
451M/EC
LS
PR2438

PR2438

Facsimile Transmission

*This company uses RightFAX® fax
server software from RightFAX, Inc.*

From: **Name:** USPTO ASSIGNMENT DIVISION
 Fax Number:
 Voice Phone: 703-308-9723

To: **Name:** GENENTECH, INC.
 Company: PAUL NAIK, PH.D.
 Fax Number: 16508529881
 Voice Phone:

Fax Notes:

Pg#	Description
-----	-------------

1	Cover Page
---	------------

2	674.TXT
---	---------

4	Document 1, Batch 386232
---	--------------------------

PTAS FAX PROCESSING

Date and time of transmission: Monday, November 29, 2004 5:07:00 PM
Number of pages including this cover sheet: 04



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231



NOVEMBER 29, 2004

PTAS

700132882

GENENTECH, INC.
PAUL NAIK, PH.D.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 11/19/2004

REEL/FRAME: 015395/0288
NUMBER OF PAGES: 2

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR2138

ASSIGNOR:
DENNIS, MARK S.

DOC DATE: 11/09/2004

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080-4990

SERIAL NUMBER: 60598991
PATENT NUMBER:
TITLE: HUMANIZED ANTI-CMET ANTAGONISTS

FILING DATE: 08/05/2004
ISSUE DATE:

457/452

RightFax

11/28/04 5:07

PAGE 003/004

Fax Server

~~153~~ 453

015395/0298 PAGE 2

SHARON BROOKS, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

454

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.

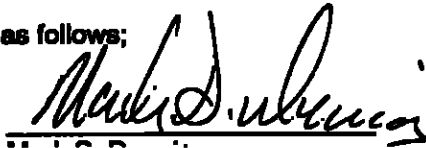
Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts 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,



Mark S. Dennis

13:9990P
455

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

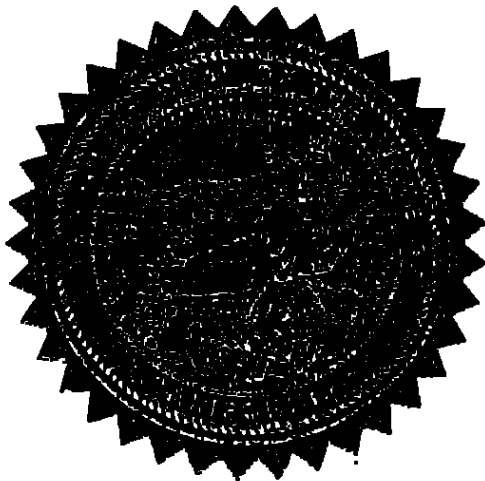
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by AIDA 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



[Signature]

Secretary of State

[Signature]

456

CALIF RNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

ss.

On December 6, 2005

before me,

Aida Miclat Guian

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

personally appeared

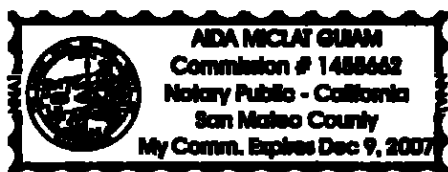
Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

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



WITNESS my hand and official seal.

Aida Miclat 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

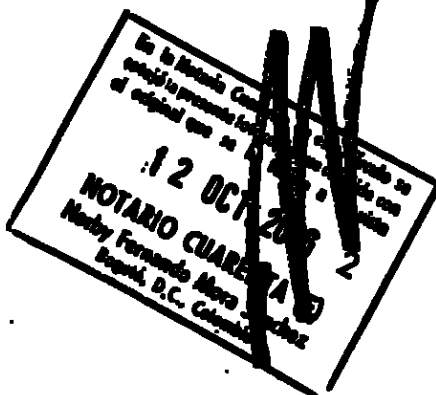
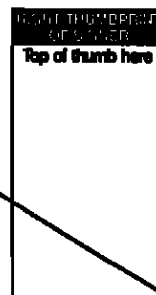
☐ Attorney-in-Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer is Representing: _____



Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

457

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)

I (We)

Genentech, Inc.
1 DNA Way

domiciliado(s) en

domiciled in South San Francisco, California 94080-4990
USA

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

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

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

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

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 18-58 Piso 9, mis (nuestras) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 18-58, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en

South San Francisco, California
USA

hoy de de 200_

Granted and signed in

Firma

this 6th day of December 2005

Nombre
Cargo

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



452 458

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.

En la Notaría compareció de acta
notariada la presente fotocopia que
el original que se ha tenido
12 OCT. 2002
NOTARIO CUARENGO
Néstor Fernando Mora
Bogotá, D.C., Colombia

460 459

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

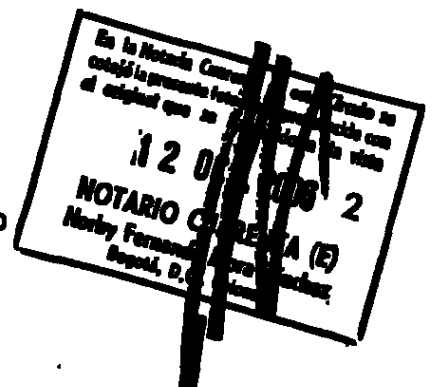
CERTIFICADO

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



460

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

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14558812
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 válida para las personas que se basan en el documento y puede
prevenir la remoción y reescritura fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

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

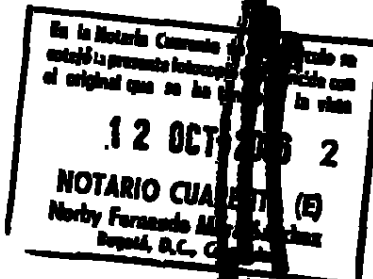
Capacidad(es) Relvindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

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

Huella índice dedo del firmante
Parte alta del dedo aquí

El firmante representa: _____



46 461

AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresniak, 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.



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**

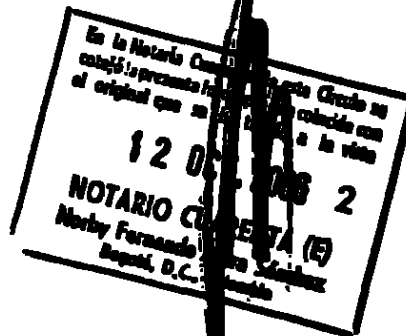
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



464 463

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

465 464

**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

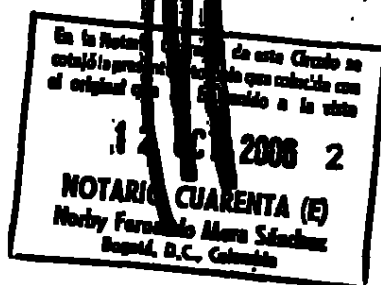
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones puedan 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



465

**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

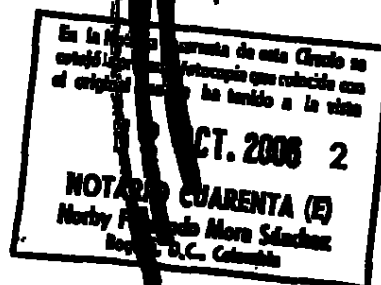
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

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



466

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;

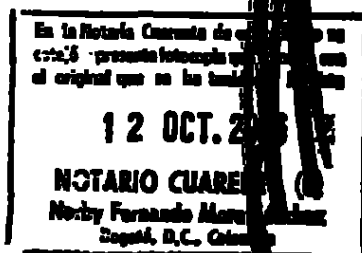
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(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



468 467

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.

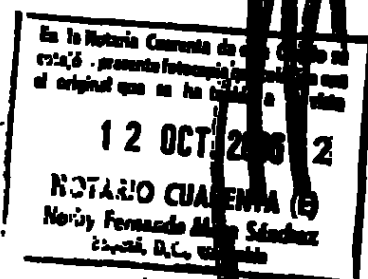
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 80% de las acciones con derecho a votar las mismas.

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

SECCION 5.02. Enmienda del Certificado de Incorporación. La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 80% 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



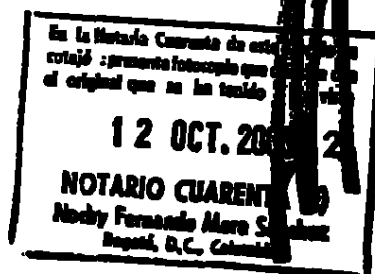
468

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 8.02. *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 8.03. *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



472 u6a
permite 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 pueda, 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.

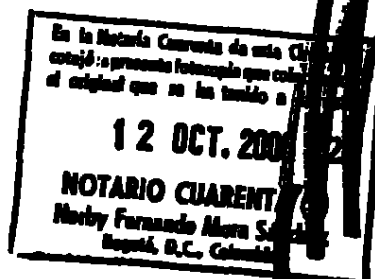
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, 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.



470

ARTICULO 8

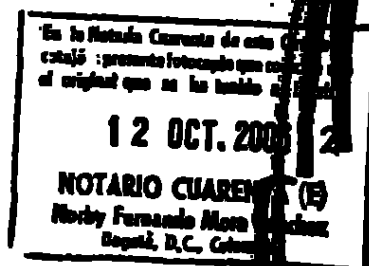
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define 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 artículos 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

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

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

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

En el evento que Roche adquiera conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho

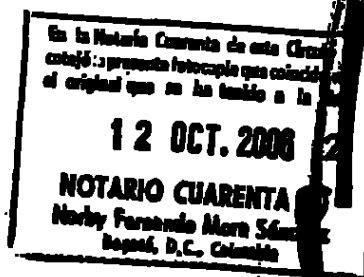


444 421
que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. Oportunidades Corporativas. En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

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

SECCION 8.05, Definiciones. Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (como se



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

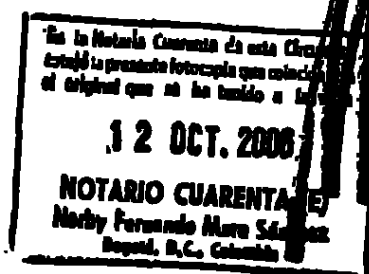
475
472

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 suceder 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.



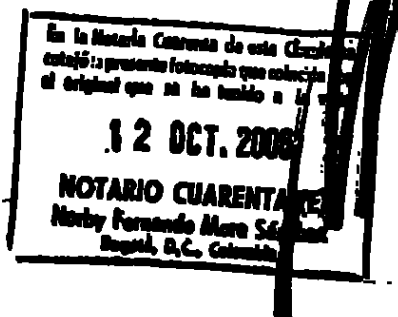
444 473

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

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

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

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



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

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

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

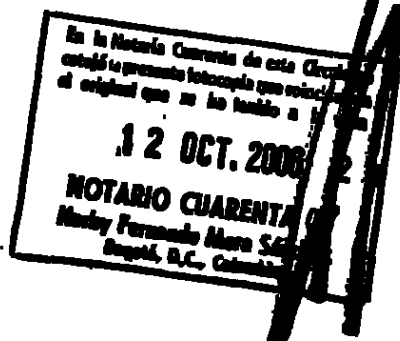
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



476

475

Apostille

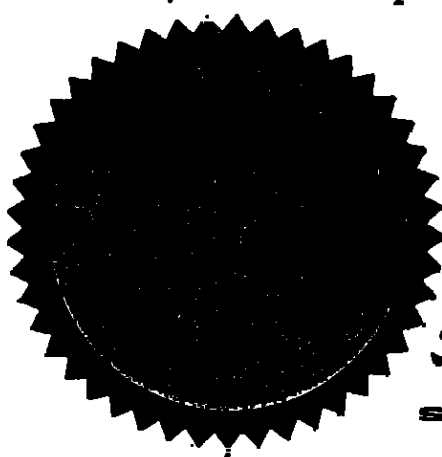
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

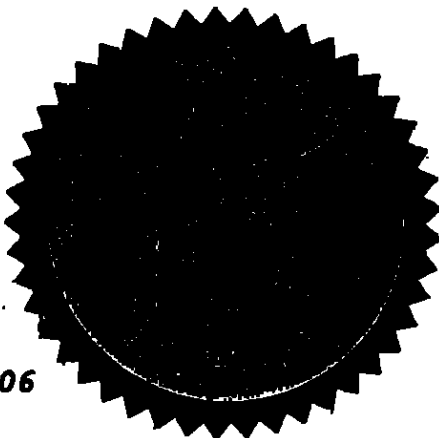
En la Notaría Cuarenta de este
certifiqué: a presento fotocopia que es
el original que no ha tenido
12 OCT. 2005
NOTARIO CUARENTA
Norbey Fernando More
Bogotá, D.C., Colombia

Delaware

476
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

478
477

**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

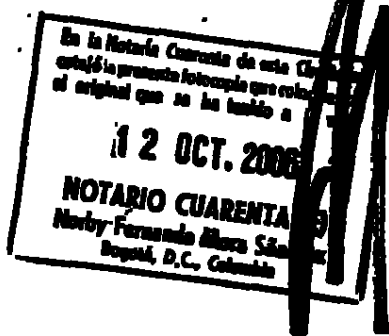
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

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

478

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, per value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, per value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

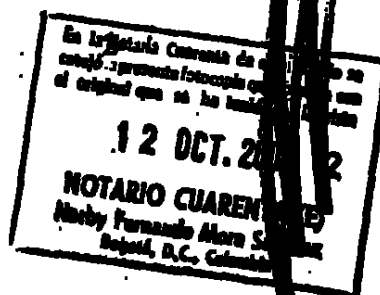
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the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



479

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;

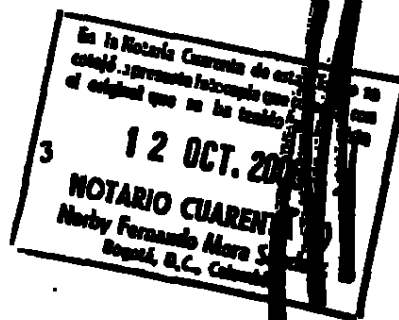
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(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.



481 480

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



481

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.

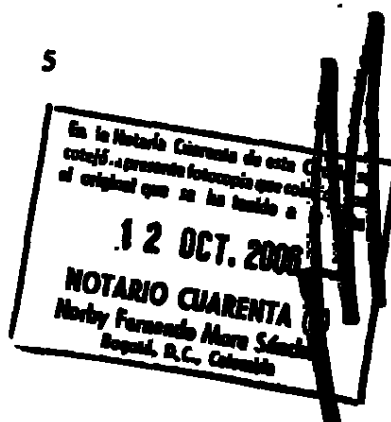
SECTION 6.02. Ballots. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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



487 482

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.

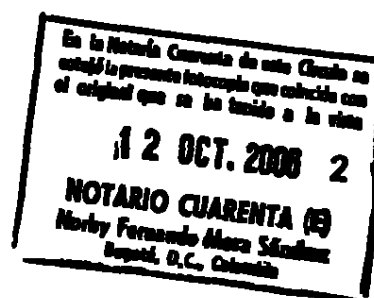
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect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



483

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

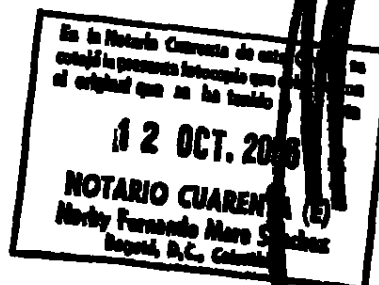
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(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.



484

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.

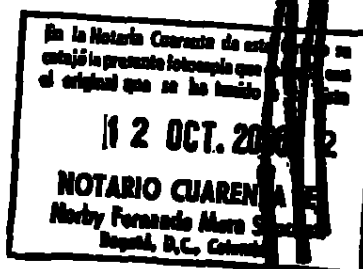
SECTION 8.05. Definitions. For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or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



485

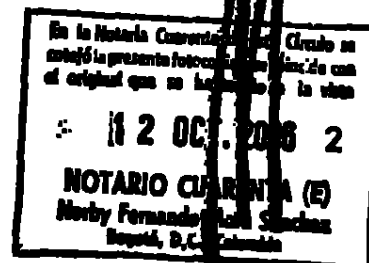
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment,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



486

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.



488 487

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



488

97.200
2/5
488

Apostille

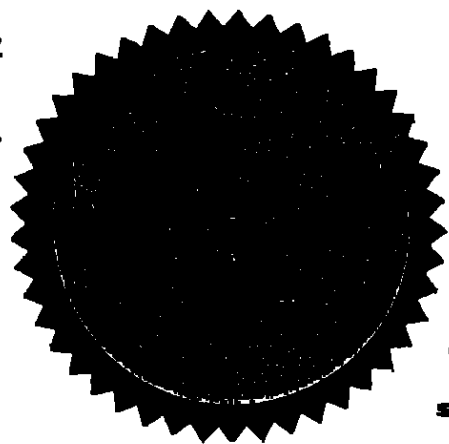
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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. 0254031

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

En la Notaría Cuarenta de la ciudad de Bogotá se
certificó la presente fotocopia que es fiel y
el original que se ha tenido a la vista.

12 OCT. 2005

NOTARIO CUARENTA (C)

Norby Fernando Alvarado

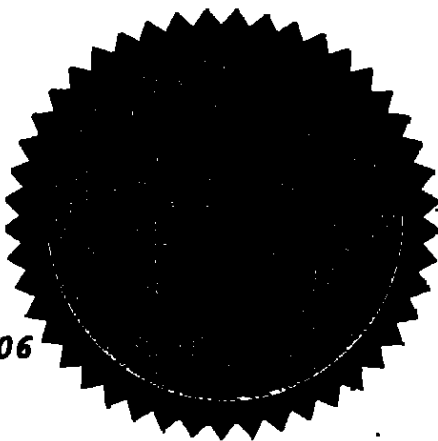
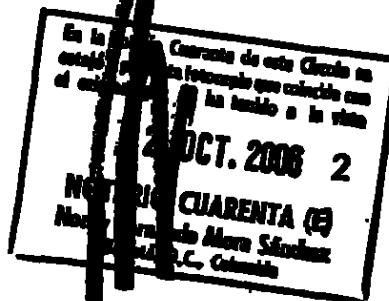
Bogotá, D.C., Colombia

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

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

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

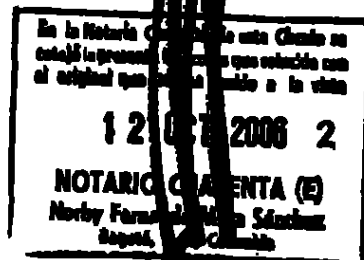
GENENTECH, INC.

By:

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

75841



491

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

APOSTILLA

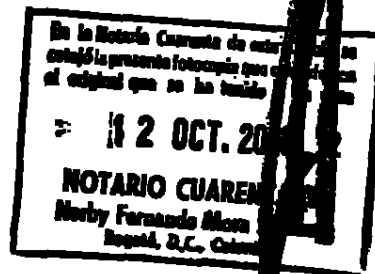
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

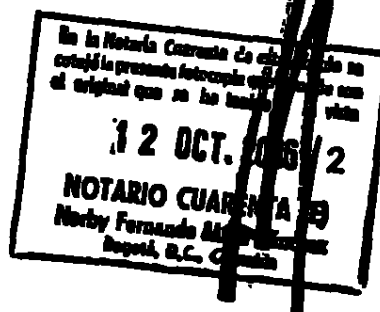
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



492

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

494 493

**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.

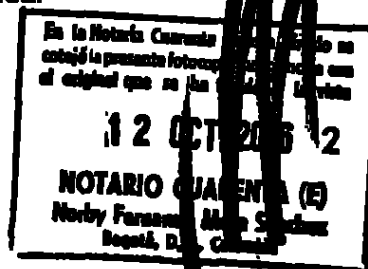
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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.



1/9/00 494

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

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

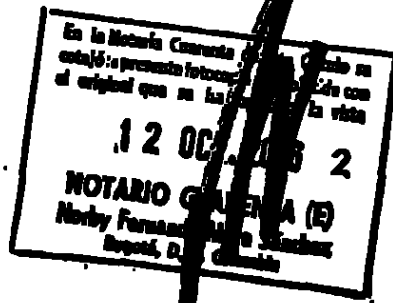
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

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

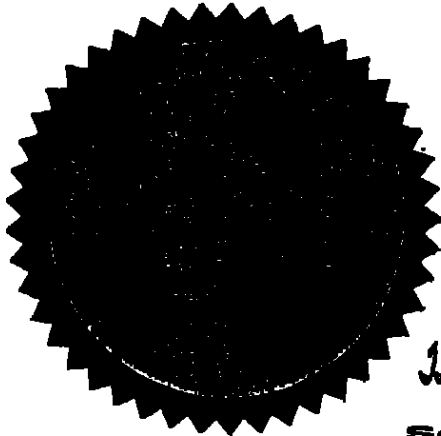
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

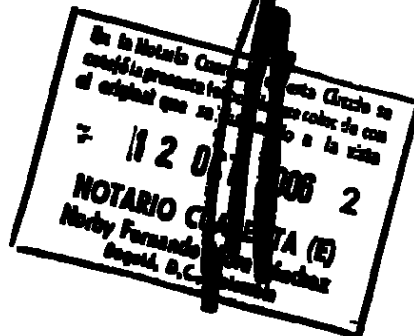
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

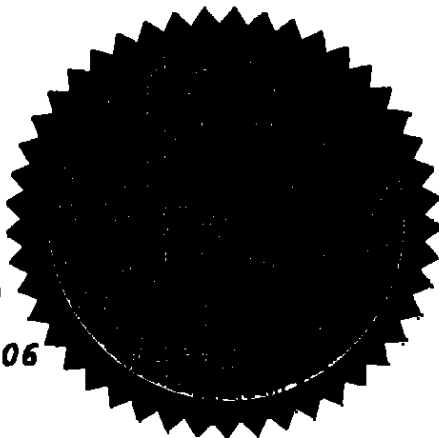
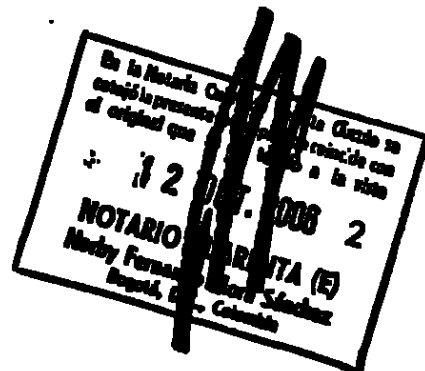


Delaware

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

**CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION**

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

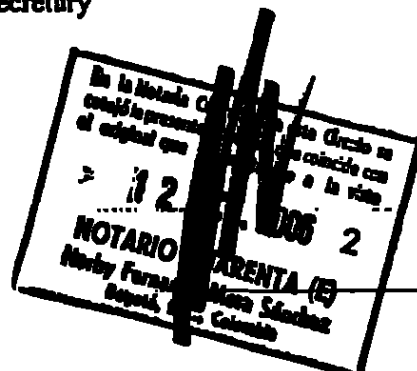
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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

GENENTECH, INC.

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

#153087



APOSTILLA

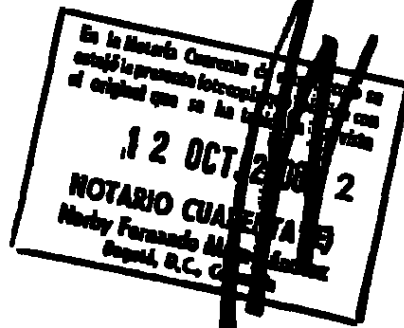
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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



~~30~~ 499

He is Notario General
 notary is present for the purpose of the
 of original one as a notary public can
 12 OCT 2006 2
 NOTARIO PUBLICO (S)
 Morley Farnsworth Siles Siles
 Bogotá, Colombia

FECHA: 05 - 24 - 05

321
500

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

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

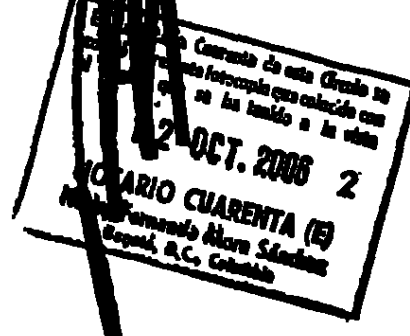
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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

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

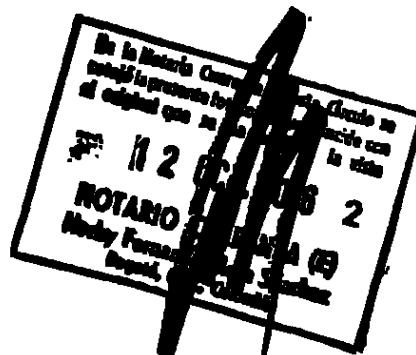
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



93 300
27
82

Apostille

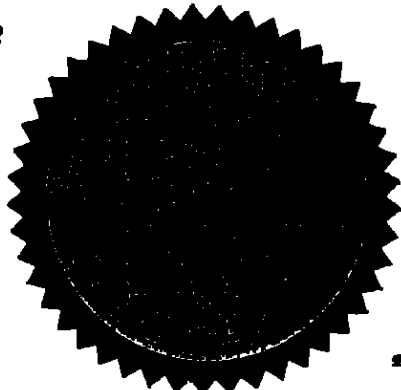
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

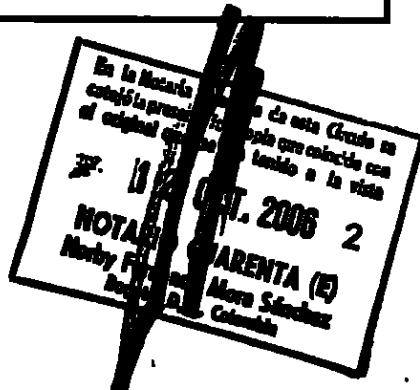
5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



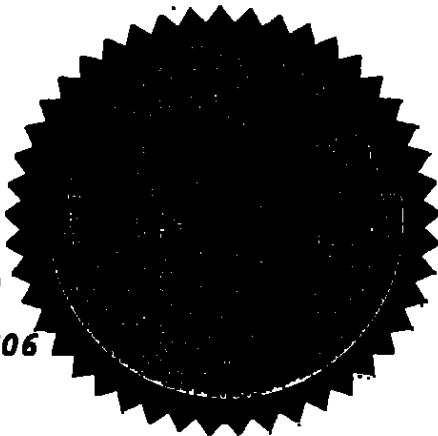
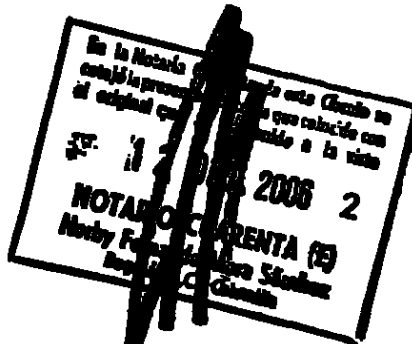
Delaware

PAGE 1

201/503

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

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

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

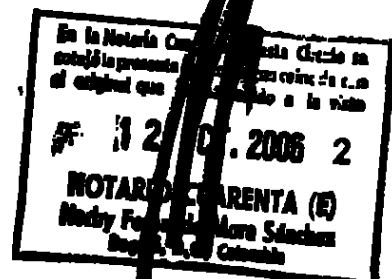
GENENTECH, INC.

By:

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

24747



505
505

APOSTILLA

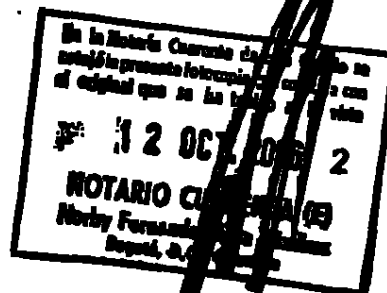
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

306

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

308
502

**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.

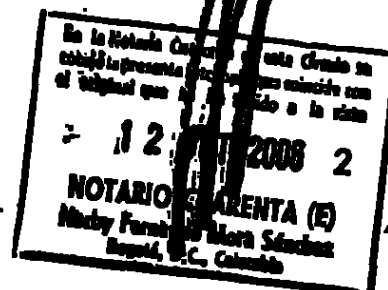
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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.



704
508

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

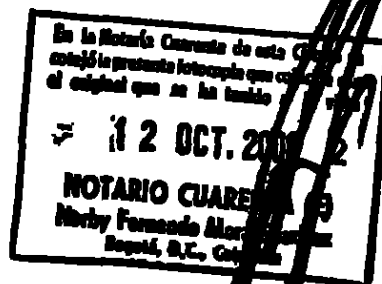
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- ◆ Descripción de la invención [✓]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ~~[✓]~~
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia M Nerva
Firma Responsable

Fecha _____

Camara 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

510

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

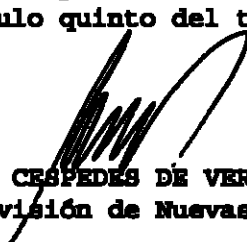
REFERENCIA	Radicación No.	7 12528
	Solicitud internacional	PCT/UB2005/027626
	Fecha inicio fase nacional	05/03/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3274

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDÉS DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 09 MAR, 2007
adpall