



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-094381- -00000-0000

Fecha: 2013-04-11 17:08:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 172

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-078672- -00006-0000

Fecha: 2013-04-11 17:08:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 172

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ ANTICUERPOS ANTI-VEGF

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ GENENTECH, INC.

DOMICILIO _____ SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

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

22. BOGOTÁ, D.C., _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 10-078672- -00006-0000 Fecha: 2013-04-11 17:08:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 851 DIVISIONAL Folios: 172	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5  No. 13-094381- -00000-0000 Fecha: 2013-04-11 17:08:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 172
---	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural

☐

Persona Jurídica

☒

GENENTECH, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	1 DNA Way, South San Francisco, 94080-4990 California, Estados Unidos de América	South San Francisco
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

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

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

De Páez Luz Clemencia

C.C. 35.456.344

T.P.A. 23.555

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

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

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente _____

De: _____

A: _____

DIVISION

Expediente : 10.078.672

De: _____

A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____

A: _____

5. Comprobante de Pago No 13-0032906 Fecha: 2013/04/09
Comprobante de Pago No 13-0034046 Fecha: 2013/04/11

6. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$450.000.
- ☒ Comprobante de pago por 29 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$ 870.000
- ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

Nombre y apellidos

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 DE Usaquén

Firma

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Tarjeta Profesional 23.555

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 10.078.672. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 151 notificado por fijación en lista del 15 de enero de 2013. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 29 de junio de 2010 y la prioridad que allí se reivindica el 30 de noviembre de 2007.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 10.078.672.

ANTICUERPOS ANTI-VEGF

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 [0001] Esta invención se relaciona generalmente con secuencias de polipéptido seleccionadas anti-VEGF y anticuerpos con propiedades benéficas para propósitos de investigación, diagnósticos y terapéuticos.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

10

- [0002] El desarrollo de un sistema vascular es un requerimiento fundamental para muchos procesos patológicos y fisiológicos. Los tejidos que crecen activamente tal como embriones y tumores requieren suministro sanguíneo adecuado. Ellos satisfacen esta necesidad al producir factores pro-angiogénicos, que promueven la formación de nuevos
- 15 vasos sanguíneos por vía de un proceso llamado angiogenia. La formación de tubo vascular es un evento biológico complejo pero ordenado que involucra todas o muchas de las siguientes etapas: a) Células endoteliales (EC) que proliferan de EC existentes o diferenciadas de células progenitoras; b) las EC migran y se unen para formar estructuras similares a cuerdas; c) las cuerdas vasculares que luego experimentan tubulogenia para
- 20 formar vasos con un lumen central; d) existen cuerdas o vasos que envían brotes para formar vasos secundarios; e) el plexo vascular primitivo experimenta remodelamiento y reorganización adicional; y f) células peri-endoteliales se recolectan para almacenar los tubos endoteliales, proporcionando mantenimiento y funciones moduladoras a los vasos; tales células incluyen pericitos para capilares pequeños, células de músculo liso para
- 25 vasos más grandes, y células miocárdiales en el corazón. Hanahan, D. Science 277:48-50 (1997); Hogan, B. L. & Kolodziej, P. A. Nature Reviews Genetics. 3:513-23 (2002); Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. Cell. 112:19-28 (2003).

- [0003] Está bien establecido que la angiogenia se implica en la patogenia de una variedad
- 30 de trastornos. Estos incluyen tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, enfermedades neovasculares intraoculares tal como retinopatías proliferativas, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), glaucoma neovascular, rechazo inmune de tejido corneal trasplantado y otros tejidos, artritis reumatoide, y soriasis. Folkman et al., J. Biol.
- 35 Chem., 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol. 53:217-239 (1991); y Garner A., "Vascular diseases," In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

[0004] En el caso de crecimiento de tumor, la angiogenia parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia, y para proporcionar nutrición para el crecimiento y metástasis del tumor. Folkman et al, Nature 339:58 (1989). La neovascularización permite a las células de tumor adquirir una ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa comparado con células normales. Un tumor usualmente empieza como una célula aberrante única, que puede proliferar solo a un tamaño de unos pocos milímetros cúbicos debido a la distancia de glóbulos capilares disponibles, y este puede permanecer 'latente' sin crecimiento adicional y diseminación durante un largo periodo. Algunas células de tumor cambian al fenotipo angiogénico para activar células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos nuevamente formados no solo permiten continuar el crecimiento del tumor primario, sino también para la diseminación y recolonización de células de tumor metastásicas. De acuerdo con lo anterior, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en secciones de tumor y la supervivencia del paciente en cáncer de mama así como también en varios otros tumores. Weidner et al, N. Engl. J. Med 324:1-6 (1991); Horak et al, Lancet 340: 1120-1 124 (1992); Macchiarini et al, Lancet 340:145-146 (1992). Los mecanismos precisos que controlan el cambio angiogénico no se entienden bien, pero se considera que la neovascularización de la masa de tumor resulta del balance solo de una multitud de estimuladores e inhibidores de la angiogenia (Folkman, Nat Med 1(1):27-31 (1995)).

[0005] El proceso de desarrollo vascular es bastante regulado. A la fecha, se ha mostrado un número significativo de moléculas, la mayoría de factores secretados producidos por células circundantes, regulan la diferenciación de EC, proliferación, migración y coalescencia en estructuras similares a cuerda. Por ejemplo, se ha identificado el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como el factor clave involucrado en estimular la angiogenia y en inducir permeabilidad vascular. Ferrara et al, Endocr. Rev. 18:4-25 (1997). El hallazgo que la pérdida de aún un único alelo VEGF resulta en puntos de letalidad embrionaria para un papel irremplazable jugado por este factor en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular. Adicionalmente, el VEGF ha mostrado ser un mediador clave de neovascularización asociado con tumores y trastornos intraoculares. Ferrara et al, Endocr. Rev. supra. El mRNA VEGF se sobreexpresa por la mayoría de tumores humanos examinados. Berkman et al, J. Clin. Invest. 91 :153-159 (1993); Brown et al, Human Pathol. 26:86-91 (1995); Brown et al, Cáncer Res. 53:4727-4735 (1993); Mattern et al, Brit. J. Cáncer 73:931-934 (1996); Dvorak et al, Am. J. Pathol. 146: 1029-1039 (1995).

[0006] También, los niveles de concentración del VEGF en los fluidos oculares se correlacionan altamente con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatías diabéticas y otras relacionadas con isquemia. Aiello et al, N.

Engl. J. Med. 331: 1480-1487 (1994). Adicionalmente, los estudios han demostrado la ubicación de VEGF en membranas neurovasculares coroidales en pacientes afectados por AMD. Lopez et al, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868 (1996).

- 5 [0007] Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF suprimen el crecimiento de una variedad de estirpes celulares humanas en ratones sin pelo (Kim et al, Nature 362:841-844 (1993); Warren et al, J. Clin. Invest. 95:1789-1797 (1995); Borgström et al, Cáncer Res. 56:4032- 4039 (1996); Melnyk et al, Cáncer Res. 56:921-924 (1996)) y también inhiben angiogenia intraocular en modelos de trastornos retinales isquémicos. Adamis et al, Arch.
- 10 Ophthalmol. 14:66-71 (1996). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros inhibidores de VEGF son candidatos promisorios para el tratamiento de tumores y varios trastornos neurovasculares intraocular neovasculares. Se describen tales anticuerpos, por ejemplo, en EP 817,648 publicada en Enero 14, 1998; y en WO98/45331 y WO98/45332, ambos publicados en Octubre 15, 1998. Uno de los anticuerpos anti-
- 15 VEGF, bevacizumab, han sido probados por la FDA para uso en combinación con un régimen de quimioterapia para tratar el cáncer colorectal metastásico (CRC) y cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). Y el bevacizumab se ha investigado en muchos ensayos clínicos en curso para tratar varios indicios de cáncer.
- 20 [0008] Son bien conocidos otros anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-Nrp1 y anticuerpos anti-Nrp2, y se describen, por ejemplo, en Liang et al, J Mol Biol 366, 815-829 (2007) y Liang et al, J Biol Chem 281, 951 -961 (2006), Publicación PCT número WO2007/056470 y Solicitud PCT No. PCT/US2007/069179, el contenido de estas solicitudes de patente se incorpora expresamente aquí como referencia.

25

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] La invención proporciona anticuerpos anti-VEGF novedosos y sus usos.

- 30 [0010] Se proporcionan en la invención un número de anticuerpos anti-VEGF. Por ejemplo, se proporciona un anticuerpo que une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo comprende seis HVR seleccionados de:

- (i) un HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácido de $X_1X_2R X_3SL$ en donde el HVR-L1 comprende 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: X_1 es G o A; X_2 es V o I; y/o X_3 es T o R;
- 35

- (ii) un HVR- L2 que comprende la secuencia de aminoácido de DASSLA (SEQ ID NO:6);

(iii) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SYKSPL (SEQ ID NO:7);

(iv) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SISGSWIF (SEQ ID NO:1);

5

(v) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de G AIWPFGG YTH (SEQ ID NO:2).; y

(vi) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de RWGHSTSPWAMDY (SEQ ID NO:3).

10

[0011] En otra realización, se proporciona un anticuerpo que une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo comprende:

15

(i) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

20

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:4;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

25

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

[0012] En otra realización, se proporciona un anticuerpo que une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo comprende:

30

(i) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:1;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

35

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:5;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

[0013] En otra realización, se proporciona un anticuerpo que une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o SEQ ID NO:45.

[0014] En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo anti-VEGF comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o 45. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:45.

[0015] En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anteriores es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')₂. En una realización, el anticuerpo es humanizado. En una realización, el anticuerpo es humano. En todavía otra realización, por lo menos una porción de la secuencia de estructura es una secuencia de estructura consensus humana.

[0016] Se proporcionan los polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos anteriores, así como también vectores que comprenden los polinucleótidos y células anfitrionas que comprenden los vectores de la invención. En una realización, la célula anfitriona es eucariótica. En otra realización, la célula anfitriona es una célula CHO. También se proporciona un método para elaborar un anticuerpo anti-VEGF. Por ejemplo, un método comprende cultivar la célula anfitriona bajo condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, e aislar el anticuerpo.

[0017] En un aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia de VEGF en una muestra biológica, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de la invención bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a VEGF, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y VEGF. En una realización, el método comprende detectar el complejo de anticuerpo VEGF-anti-VEGF en una muestra biológica en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF

comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o 45. En todavía otra realización, el método comprende detectar el complejo de anticuerpo VEGF-anti-VEGF en una muestra biológica en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44. En todavía otra realización, el método comprende detectar el complejo de anticuerpo VEGF-anti-VEGF en una muestra biológica en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:45. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF se marca detectablemente.

[0018] También se proporcionan composiciones farmacéuticas así como también métodos de tratamiento. En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, se proporciona un método para tratar el cáncer, por ejemplo, el método comprende administrar a un individuo la composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriores. Los cánceres tratados por los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de célula epidermoide, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma epidermoide del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer estromal gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer renal o de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroide, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de esparcido superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginoso acral, melanomas nodulares, linfoma de célula B, leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de célula capilar; leucemia de mieloblastos crónica; trastorno linfoproliferativo post-transplante (PTLD), proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema asociado con tumores de cerebro, o Síndrome de Meigs. En ciertas realizaciones, el tumor, cáncer o trastorno proliferativo de célula que se trata es cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama o glioblastoma. En todavía otra realización, el sujeto que se trata es humano.

[0019] La invención proporciona adicionalmente inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente, tal como un fármaco o agente citotóxico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020] Figura 1: Las secuencias de bucle HVR de cadena pesada y cadena liviana de anticuerpos anti-VEGF. Las figuras muestran las secuencias HVR de cadena pesada, H1, H2, y H3, y las secuencias HVR de cadena liviana, L1, L2, y L3. El número de secuencia es como sigue: clon B20-4.1.1 (HVR-H1 es SEQ ID NO: 1; HVR-H2 es SEQ ID NO:2; HVR-H3 es SEQ ID NO:3; HVR-L1 es SEQ ID NO:4; HVR-L2 es SEQ ID NO:6; HVR-L3 es SEQ ID NO:7); y clon B20-4.1.1RR (HVR-H1 es SEQ ID NO: 1 ; HVR-H2 es SEQ ID NO:2; HVR-H3 es SEQ ID NO:3; HVR-L1 es SEQ ID NO:5; HVR-L2 es SEQ ID NO:6; HVR-L3 es SEQ ID NO:7).

[0021] Las posiciones de aminoácido se enumeran de acuerdo con el sistema de numeración Kabat como se describe adelante.

[0022] Figuras 2a y 2b: se describe la secuencia de estructura consensus humana receptora de ejemplo para uso en practicar la actual invención con identificadores de secuencia como sigue:

Estructuras consensus (VH) pesadas variables

- Estructura consensus subgrupo I VH humano menos CDR Kabat (SEQ ID NO:8)
- estructura consensus subgrupo I VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs:9-11)
- estructura consensus subgrupo II VH humana menos CDR Kabat (SEQ ID NO:12)
- estructura consensus subgrupo II VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 13- 15)
- estructura consensus subgrupo II VH humana menos estructura consensus subgrupo III VH humana extendida menos CDR Kabat (SEQ ID NO: 16)
- estructura consensus subgrupo III VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 17-19)
- estructura receptora VH humana menos CDR Kabat (SEQ ID NO:20) estructura receptora VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs:21-22)
- estructura 2 receptora VH humana menos CDR Kabat (SEQ ID NO:23) estructura 2 receptora VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs:24-26)

[0023] Las posiciones de aminoácido se enumeran de acuerdo con el sistema de numeración Kabat como se describe adelante.

[0024] Figura 3: describe secuencias de estructura consensus humanas receptoras de ejemplo para uso en practicar la actual invención con identificadores de secuencia como sigue:

5 Estructuras consensus (VL) livianas variables

estructura consensus subgrupo I kappa VL humana (SEQ ID NO:27)
estructura consensus subgrupo II kappa VL humana (SEQ ID NO:28) estructura
consensus subgrupo III kappa VL humana (SEQ ID NO:29) estructura consensus
10 subgrupo IV kappa VL humana (SEQ ID NO:30)

[0025] Figura 4: describe secuencias de región de estructura de las cadenas liviana y pesada huMAb4D5-8. Los Números en superíndice/negrilla indican las posiciones de aminoácido de acuerdo con Kabat.

[0026] Figura 5: describe secuencias de región de estructura modificada/variante de cadenas pesada y liviana huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrilla indican las posiciones de aminoácido de acuerdo con Kabat.

20 [0027] Figura 6: La secuencia de aminoácidos de las secuencias HVR de cadena liviana L1, L2 y L3 para anticuerpos anti-VEGF B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR.

[0028] Figura 7: La secuencia de aminoácidos de las secuencias HVR de cadena pesada H1, H2, y H3 para anticuerpos anti-VEGF B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR.

25 [0029] Figura 8: describe las regiones variables de cadena liviana de clones de anticuerpo B20-4.1.1 (SEQ ID NO:44) y B20-4.1.1 RR (SEQ ID NO:45).

[0030] Figura 9: describe las regiones variables de cadena pesada de clones de anticuerpo B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR (SEQ ID NO:43).

30 [0031] Figura 10: La Tabla resume la medición de afinidad de unión cinética de las variantes IgG B20 a VEGF humano y VEGF murino. El VEGF humano o murino se inmoviliza para alcanzar aproximadamente 60 unidades de respuesta.

35 [0032] Figura 11: La Tabla resume la medición de afinidad de unión cinética de los IgG variantes B20 con VEGF humano y VEGF murino. El VEGF humano o murino se inmoviliza para alcanzar aproximadamente 1000 unidades de respuesta.

[0033] Figura 12: Ensayo de incorporación de timidina HUVEC, que muestra que las variantes B20 pueden inhibir efectivamente la proliferación celular HUVEC.

[0034] Figura 13: describe el efecto de B20-4.1.1 en la proliferación BRME inducida por VEGF.

[0035] Figura 14: describe el efecto de B20-4.1.1 en el crecimiento de tumor en ratones desnudos con células de tumor humanas de xenoinjerto (células A549), según se mide mediante volúmenes de tumor sobre el número de días de tratamiento.

[0036] Figura 15: describe el efecto de B20-4.1.1 en el crecimiento de tumor en ratones desnudos con células de tumor humanas de xenoinjerto (células MDA-MB231), según se mide mediante volúmenes de tumor sobre el número de días de tratamiento.

[0037] Figura 16: describe el efecto del anticuerpo avastina en la proliferación BRME inducida por VEGF. La inhibición de mVEGF no se observa en una concentración de hasta 1500 nM del anticuerpo avastina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0038] La invención aquí proporciona anticuerpos aislados que unen a VEGF y sus usos. También se proporcionan composiciones farmacéuticas así como también métodos de tratamiento.

[0039] La invención proporciona adicionalmente métodos para elaborar anticuerpos anti-VEGF, y polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-VEGF.

Técnicas Generales

[0040] Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados aquí se entienden bien generalmente y se emplean comúnmente utilizando la metodología convencional por aquellos expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTICUERPOS, A LABORATORY MANUAL, AND ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Métodos in

Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley y Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley y Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles y Practice of Oncology (V. T. DeVita et al, eds., J. B. Lippincott Company, 1993).

Definiciones

[0041] Para propósitos de interpretar esta especificación, se aplicarán las siguientes definiciones y, según sea apropiado, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el evento que cualquier definición establecida adelante entre en conflicto con cualquier documento incorporado aquí como referencia, la definición establecida adelante debe controlar.

[0042] El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos {por ejemplo, anticuerpos biespecíficos}, y fragmentos de anticuerpo mientras ellos exhiben la actividad biológica deseada.

[0043] El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de ocurrencia natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Así, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, tal un anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que une un objetivo, en donde la secuencia de polipéptido que une el objetivo se obtienen mediante un proceso que incluye la selección de una secuencia de

polipéptido que une al objetivo única de una pluralidad de secuencias de polipéptido. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones fago, o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión objetivo seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad para el objetivo, para humanizar la secuencia de unión objetivo, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión objetivo alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. En contraste a las preparaciones de anticuerpo policlonal, que incluyen típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. En adición a su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas en que ellas no se contaminan típicamente por otras inmunoglobulinas.

[0044] El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo cuando se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construye como la producción requerida del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser utilizados de acuerdo con la presente invención se pueden hacer mediante una variedad de técnicas, que incluye, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,816,567), tecnologías de exhibición de fago (ver, por ejemplo, Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Métodos* 284(1-2):

1 19-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016; Marks et al, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al, *Nature Biotechnol* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[0045] Los anticuerpos monoclonales aquí incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena liviana y/o pesada es idéntica con o homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras el resto de la cadena o cadenas es idéntico con o homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a clases o subclases de anticuerpos, así como también fragmentos de tales anticuerpos, mientras ellos exhiben la actividad biológica deseada (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,816,567; y Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en donde la región de unión de antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido por, por ejemplo, monos macaco inmunizantes con el antígeno de interés.

[0046] "Humanizado" formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en el que los residuos de un HVR del receptor se reemplazan por residuos de un HVR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, o primate no humano que tiene la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad. En algunos casos, los residuos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o donar en el anticuerpo donante. Se pueden hacer estas modificaciones para refinar adicionalmente desarrollo de anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todo o sustancialmente todo de los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana, y todo o sustancialmente todos de los FR son aquellos de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver, por ejemplo, Jones et al, Nature 321 :522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Ver también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y Patente Estadounidense Nos. 6,982,321 y 7,087,409.

[0047] Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácido que corresponde a aquel de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha hecho utilizando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos como se describe aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Se pueden producir anticuerpos humanos utilizando varias técnicas conocidas en el arte, que incluyen colecciones de exhibición de fago. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581 (1991). También disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos son métodos descritos en Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cáncer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al, J. Immunol, 147(l):86-95 (1991). Ver también van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol, 5: 368-74 (2001). Se pueden preparar anticuerpos humanos al administrar el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyo locus endógeno se han deshabilitado, por ejemplo, xenoratos inmunizados (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 6,075, 181 y 6,150,584 con respecto a tecnología XENOMOUSE™). Ver también, por ejemplo, Li et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados por vía de una tecnología de hibridoma de célula B humana.

[0048] Un "anticuerpo dependiente de especie" es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte para un antígeno de una primera especie de mamífero que tiene para un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene una afinidad de unión (K_d) 7 o valor de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y más preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión para un homólogo del antígeno que esconde una segunda especie de mamífero no humana que es por lo menos aproximadamente 50 veces, o por lo menos aproximadamente 500 veces, o por lo menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión para el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los varios tipos de anticuerpos como se definió anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humano o humanizado.

[0049] Como se utiliza aquí, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de secuencia de aminoácido del anticuerpo que depende de la especie en donde se ha modificado uno o más de los residuos de aminoácido del anticuerpo que depende de la especie. Tales mutantes necesariamente tienen menos de 100% de identidad de secuencia o similar con el anticuerpo dependiente de especie. En una realización, el mutante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácido que tiene por lo

menos 75% de identidad de secuencia de aminoácido o similar con la secuencia de aminoácido del dominio variable de cadena liviana o pesada del anticuerpo que depende de especie, en otra realización por lo menos 80%, en otra realización por lo menos 85%, en otra realización por lo menos 90%, y todavía en otra realización por lo menos 95%. La identidad o similitud con respecto a su secuencia se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, mismo residuo) o similar (es decir, residuo de aminoácido del mismo grupo con base en propiedades de cadena lateral común, ver adelante) con los residuos de anticuerpo dependiente de especie, después alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para alcanzar la identidad de secuencia de porcentaje máximo. Ninguna de las extensiones de terminal N, terminal C, o extensiones internas, eliminaciones, o inserciones en la secuencia de anticuerpo fuera del dominio variable construirse debe construir cuando se afecta la identidad de secuencia o similar.

[0050] Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con la investigación, usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) a más de 95% en peso del anticuerpo según se determina por, por ejemplo, el método Lowry, y en algunas realizaciones, en más de 99% en peso; (2) botaina un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de terminal N o secuencia de aminoácido interno mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de copa de giro, o (3) para homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o no reducción utilizando, por ejemplo, tinte plata o azul Coomassie. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes debido a por lo menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0051] "anticuerpos nativos" son usualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltons, compuestas de dos cadenas livianas idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena liviana se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre la cadena pesada de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y liviana también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada atiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena liviana tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena liviana se

alineada con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena liviana se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Los residuos de aminoácido particulares se consideran para formar una interface entre los dominios variables de cadena pesada y de cadena liviana.

5

[0052] La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios de terminal amino de la cadena pesada y liviana del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede referir como "VH." El dominio variable de la cadena liviana se puede denominar como "VL." Estos dominios son generalmente la mayoría de partes variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

10

[0053] El término "variable" se refiere al hecho que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de anticuerpos. Esto se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR) ambos en los dominios variables de cadena liviana y de cadena pesada. Las porciones más altamente concentradas de dominios variables se llaman las regiones de estructura (FR). Los dominios variables de las cadenas liviana y pesada nativa cada una comprenden cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Los HVR en cada cadena se mantienen juntos en proximidad cercada mediante las regiones FR y, con los HVR de la otra cadena, contribuye a la formación del sitio de unión de antígeno de anticuerpos (ver Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no se involucran directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tal como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

15

20

25

30

[0054] Las "cadenas livianas" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquiera de las especies de vertebrados se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), con base en las secuencias de aminoácido de sus dominios constantes.

35

[0055] Dependiendo de las secuencias de aminoácido de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos (inmunoglobulinas) a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂,

IgG₃, IgG₄, IgA₁, y IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y tres configuraciones dimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas bien conocidas y descritas generalmente en, por ejemplo, Abbas et al,

5 Cellular y Mol. Immunology, 4th ed. (W. B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

[0056] Los términos "anticuerpo de longitud completa," "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan intercambiamente aquí para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, sin fragmentos de anticuerpo como se define adelante. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

15 [0057] Un "anticuerpo desnudo" para los propósitos aquí es un anticuerpo que no se conjuga con un grupo funcional citotóxico o radiomarcado.

[0058] "Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente que comprende la región de unión a antígeno de este. Ejemplos de

20 fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

[0059] La digestión de Papaina de anticuerpos produce dos fragmentos de antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión de antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento de pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y es todavía capaz de reticular el antígeno.

30 [0060] "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana en asociación estrecha no covalente. En una especie de cadena única Fv (scFv), un dominio variable de cadena liviana y un dominio variable de cadena pesada se puede unir

35 covalentemente a un ligador péptido flexible de tal manera que las cadenas liviana y pesada se puede asociar en una estructura "dimérica" análoga a aquella en especies Fv de dos cadenas. Esto es en esta configuración que los tres HVR de cada dominio variable interactúa para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo.

Sin embargo, aún un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir el antígeno, aunque en una baja afinidad que el sitio de unión completo.

5 [0061] El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena liviana y pesada y también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab mediante la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. El Fab' -SH es la
10 designación aquí para Fab' en la que los residuos cisteína de los dominios constantes lleva un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se producen originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisternas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

15 [0062] Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden anticuerpo los dominios VH y VL de anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido único. Generalmente, el polipéptido scFv comprende adicionalmente un ligador de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite el scFv para formar la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión de scFv,
20 ver, por ejemplo, Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

[0063] El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Al utilizar un ligador que es muy pequeño para permitir formar pares entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a formar pares con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más
25 completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. , Nat. Med. 9: 129- 134 (2003); y Hollinger et al. , Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 6444-6448 (1993). Los trianticuerpos o tetraanticuerpos también se describen en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

35 [0064] El término "región hipervariable," "HVR," o "HV," cuando se utiliza aquí se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en los VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, el H3 y L3 exhiben la mayor diversidad de los seis HVR, y H3 en particular se considera

que juega un único papel en conferir especificidad fina para los anticuerpos. Ver, por ejemplo, Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, in Methods in Molecular Biology 248: 1 -25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos camelid de ocurrencia natural que consisten de una cadena pesada solo son funcionales y estables en la ausencia de la cadena liviana. Ver, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

[0065] Un número de delimitaciones HVR están en uso y se abarcan aquí. Las Regiones Determinantes de Complementariedad Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y se utilizan más comúnmente (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). La Chothia se refiere en su lugar a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los HVR AbM representan un compromiso entre los HVR Kabat y bucles estructurales Chothia, y se utilizan mediante software de modelamiento de anticuerpo AbM de Oxford Molecular. Los HVR "contacto" están con base en análisis de las estructuras de cristal de complejo disponible. Los residuos de cada uno de estos HVR se anotan adelante.

Bucle	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

[0066] Los HVR pueden comprender "HVR extendidos" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (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 de dominio variable se enumeran de acuerdo con Kabat et al, supra, para cada una de estas definiciones.

[0067] "Estructura" o residuos "FR" son aquellos residuos de dominio variable diferentes a los residuos HVR como se define aquí.

[0068] El término "residuo de dominio variable numerado como en Kabat" o "posición de aminoácido numerado como en Kabat," y variaciones de estos, se refiere al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena liviana de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., supra. Utilizando este sistema de numeración, la actual secuencia de aminoácido lineal puede contener pocos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento, o inserción en, un FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido único (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después el residuo 52 de H2 y residuos insertados {por ejemplo, residuos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después el residuo 82 de cadena pesada FR. La numeración Kabat de los residuos se puede determinar por un anticuerpo dado para alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia de numeración Kabat "estándar".

[0069] El sistema de numeración Kabat se utiliza generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente 1-107 residuos de la cadena liviana y 1-113 residuos de la cadena pesada) (por ejemplo Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se utiliza generalmente cuando se refiere a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU reportado en Kabat et al, supra). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuo del anticuerpo EU IgG1 humano. A menos que se indique aquí, las referencias para los números de residuo en el dominio variable de anticuerpos significa numeración de residuo por el sistema de numeración Kabat. A menos que se indique otra cosa aquí, las referencias para los números de residuo en el dominio constante de anticuerpos significa numeración de residuo mediante el sistema de numeración EU (por ejemplo, ver Solicitud Provisional estadounidense No. 60/640,323, Figuras para numeración EU).

[0070] Un anticuerpo "afinidad madura" es uno con una o más alteraciones en uno o más HVR de los mismos que resulta en una mejora en la afinidad del anticuerpo para antígeno, comparado con un anticuerpo padre que no posee aquellas alteraciones. En una realización, un anticuerpo de afinidad madura tiene afinidades nanomolares o aún picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos de afinidad madura se pueden producir utilizando ciertos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et al. , Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad por mezcla de dominio VH y VL. La mutagenia aleatorizada de HVR y/o residuos de estructura se describe mediante, por ejemplo, Barbas et al. , Proc Nat. Acad. Sci USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al, Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. , J. Immunol. 155:1994- 2004

(1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

[0071] Un anticuerpo "bloqueado" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Ciertos anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

[0072] Un " anticuerpo agonista," como se utiliza aquí, es un anticuerpo que imita parcialmente o completamente por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

[0073] Los anticuerpos "inhibidores de crecimiento" son aquellos que evitan o reducen la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo.

[0074] El anticuerpo "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácido) de un anticuerpo, y varía con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión del receptor Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B); y activación de célula B.

[0075] El término "región Fc" aquí se utiliza para definir una región de terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye las regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina puede variar, la región Fc de cadena pesada IgG humana se define usualmente para alargar un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o de Pro230, al terminal carboxilo del mismo. La lisina de terminal C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede remover, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o al construir por ingeniería recombinantemente el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpo con todos los residuos K447 removidos, las poblaciones de anticuerpo sin residuos K447 removidos, y las poblaciones de anticuerpo que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

[0076] Una "región funcional Fc" posee una "función efectora" de una región fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" de ejemplo incluyen unión C1q; CDC; unión

del receptor Fc; ADCC; fagocitosis; subregulación de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B; BCR), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente la región Fc a ser combinada con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando varios ensayos como se describe, por ejemplo, en las definiciones aquí.

[0077] Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácido de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y no A); región Fc IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc IgG4 humana de secuencia nativa, así como también sus variantes de ocurrencia natural.

[0078] Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácido que difiere de aquel de una región Fc de secuencia nativa por virtud de por lo menos una modificación de aminoácido, preferiblemente una o más sustituciones de aminoácido. Preferiblemente, la región Fc variante tiene por lo menos una sustitución de aminoácido comparado con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido padre, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido padre. La región Fc variante aquí poseerá preferiblemente por lo menos aproximadamente 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido padre, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% de homología de la misma, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95% de homología de la misma.

[0079] "Receptor Fc " o "FcR" describe un receptor que une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y alternativamente formas divididas de aquellos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tiene secuencias de aminoácido similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El FcγRIIA de receptor activante contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El FcγRIIB de receptor inhibidor contiene un motivo de inhibición con base en tirosina inmunoreceptora (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Ver, por ejemplo, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-

92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas et al, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)). Otros FcR, que incluyen aquellos que son idénticos en el futuro, se abarcan por el término "FcR" aquí.

- 5 [0080] El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable para la transferencia de IgG maternas a los fetos (Guyer et al, J. Immunol. 1 17:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) y la regulación de homeostasis de inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la unión a FcRn (ver, por ejemplo, Ghetie y Ward, Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al, Nature
10 Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al).

- [0081] La unión al FcRn in vivo y la vida útil del suero de polipéptidos de unión de alta afinidad FcRn humanos se puede medir, por ejemplo, en ratones transgénicos o estirpes
15 celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que los polipéptidos con una región Fc variante se administran. La WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con mejora o disminución a la unión de FcR. Ver también, por ejemplo, Shields et al, J. Biol Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

- 20 [0082] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y desarrollan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan por lo menos FcγRIII y desarrollan funciones efectoras ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas, y neutrófilos. Las células
25 efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

- [0083] La "citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que el Ig secretado se une a los receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos, y
30 macrófagos) que permite a estas células efectoras citotóxicas para unir específicamente a una célula objetivo que lleva antígeno y posteriormente mata la célula objetivo con citotoxinas. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresa FcγRIII solamente, aunque los monolitos expresan FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La expresión FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet,
35 Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede desarrollar un ensayo in vitro ADCC, tal como aquel descrito en la Patente estadounidense No. 5,500,362 o 5,821,337 o Patente Estadounidense No. 6,737,056 (Presta). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células PBMC y NK. Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se

puede evaluar in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel descrito en Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

[0084] La "Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en la presencia de complemento. La activación de la ruta de complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen a su antígeno cognato. Para evaluar la activación de complemento, se puede desarrollar un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). Las variantes de polipéptido con secuencias de aminoácido de región Fc alterada (polipéptidos con una región variante Fc) y se describen la capacidad de unión C1q incrementada o reducida, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 6,194,551 B1 y WO 1999/51642. Ver también, por ejemplo, Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

[0085] El término "anticuerpo que comprende la región Fc" se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina de terminal C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede remover, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con esta invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todo el K447 removido, o una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

[0086] "Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su patrón de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique otra cosa, como se utiliza aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su patrón Y puede estar representado generalmente mediante la constante de disociación (Kd). Se puede medir la afinidad por métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos aquí. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente unen el antígeno lentamente y tienden a disociar fácilmente, aunque los anticuerpos de alta afinidad generalmente unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer mayormente unidos. Una variedad de métodos para medir la afinidad de unión se conocen en la técnica, cualquiera de las cuales se puede utilizar para propósitos de la presente invención. Las realizaciones de ejemplo e ilustrativas específicas para medir la afinidad de unión se describen en lo siguiente.

[0087] En una realización, el "Kd" o "valor Kd" de acuerdo con esta invención se mide por un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA) desarrollado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La solución de afinidad de unión de los Fab para antígeno se miden al equilibrar Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (¹²⁵I) en la presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, luego capturar el antígeno de unión con una placa cubierta de anticuerpo anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas multipozo MICROTITER® (Thermo Scientific) se recubren durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab capturante (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9.6), y posteriormente bloqueo con 2% (p/v) albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM [¹²⁵I]-antígeno se mezclan con diluciones seriales de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab- 12, en Presta et al, Cáncer Res. 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés luego se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo mayor (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Después de esto, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución luego se remueve y la placa se lava ocho veces con 0.1% TWEEN-20™ en PBS. Cuando se han secado las placas, se agrega 150 µl/pozo de centelleo (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en el contador TOPCOUNT™ gamma (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que da menos de o igual a 20% de unión máxima se seleccionan para uso en ensayos de unión competitivos.

[0088] De acuerdo con otra realización, el valor Kd o Kd se mide al utilizar ensayos de resonancia plasmón de superficie utilizando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®- 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con antígeno inmovilizado CM5 chips a ~10 unidades de respuesta (RU). En resumen, se activan chips biosensores dextrano carboximetilados (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM acetato de sodio, pH 4.8, a 5 µg/ml (~0.2 µM) antes de inyección en una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección del antígeno, se inyecta 1 M etanolamina para bloquear grupos que no reaccionan. Para mediciones cinéticas, diluciones seriales de dos veces de Fab (0.78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0.05% de tensoactivo TWEEN-20™ (PBST) a 25°C en

una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (Software de evaluación BIACORE[®] versión 3.2) al fijar simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula as el radio Wk_{on} . Ver, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si el índice on excede $106 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, luego el índice on se puede determinar al utilizar una técnica de apagado fluorescente que mide el incremento o la reducción en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm paso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en la presencia de concentraciones incrementadas de antígeno según se mide en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments) o un espectrómetro 8000-series SLM-AMINCO[™] (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

[0089] Un "índice on ," "velocidad de asociación," "asociación de velocidad," o " k_{on} " de acuerdo con esta invención también se puede determinar como se describió anteriormente utilizando un sistema BIACORE[®]-2000 o BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

[0090] El término "sustancialmente similar" o "sustancialmente el mismo," como se utiliza aquí, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de tal manera que un experto en la técnica consideraría la diferencia entre los dos valores por ser de poco o sin significancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores K_d). la diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, y/o menos de aproximadamente 10% como una función del valor de referencia /comparador.

[0091] La frase "sustancialmente reducida," o "sustancialmente diferente," como se utiliza aquí, denota un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de tal manera que un experto en la técnica consideraría la diferencia entre los dos valores a ser de significancia estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10%, mayor de aproximadamente 20%, mayor de aproximadamente 30%, mayor de aproximadamente

40%, y/o mayor de aproximadamente 50% como una función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

[0092] Una "estructura humana receptora" para los propósitos aquí es una estructura que comprende la secuencia de aminoácido de una estructura VL o VH derivada de una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consensus humana. Una estructura humana receptora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consensus humana puede comprender la misma secuencia de aminoácido de este, o este puede contener los cambios de secuencia de aminoácido preexistentes. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácido preexistentes son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. Cuando están presentes cambios de aminoácido preexistentes en un VH, preferiblemente aquellos cambios ocurren en solo tres, dos, o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácido en aquellas posiciones puede ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, la estructura humana receptora VL es idéntica en secuencia a la estructura de inmunoglobulina humana VL o secuencia de estructura consensus humana.

[0093] Una "estructura consensus humana" es una estructura que representa los residuos de aminoácido que ocurren más comúnmente en una selección de obsecuencias de estructura VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de las secuencias es un subgrupo como en Kabat et al. , supra. En una realización, para el VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat et al., supra. En una realización, para el VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al. , supra.

[0094] Una "estructura consensus subgrupo III VH" comprende la secuencia consensus obtenido de las secuencias de aminoácido en el subgrupo III pesado variable de Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácido de estructura consensus subgrupo III VH comprende por lo menos una porción o todo de cada una de las siguientes secuencias:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:31)-H1- WVRQAPGKGGLEWV (SEQ ID NO:32)-H2-RFTISADTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:33)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:34). Ver Figura 4.

[0095] Una "estructura consensus subgrupo I VL " comprende la secuencia consensus obtenida de las secuencias de aminoácido en el subgrupo I kappa liviano variable de

Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácido de estructura consensus subgrupo I H comprende por lo menos una porción o todo de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:35)-L1 -WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:36)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:37)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:38). Ver Figura 5.

[0096] Como se utiliza aquí, "conjunto de codón" se refiere a un conjunto de diferentes secuencias triplete de nucleótido utilizadas para codificar los aminoácidos variantes deseados. Un conjunto de oligonucleótidos se puede sintetizar, por ejemplo, mediante síntesis de fase sólida, que incluye las secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótido proporcionado por el conjunto de codón y que codificará el grupo deseado de los aminoácidos. Una forma estándar de designación de codón es aquel del código IUB, que se conoce en la técnica y se describe aquí. Un conjunto de codón se representa típicamente mediante 3 letras mayúsculas en cursiva, por ejemplo, NNK, NNS, XYZ, DVK y similares. Un "conjunto de codón no aleatorizado," como se utiliza aquí, así se refiere a un conjunto de codón que codifica aminoácidos seleccionados que parcialmente cumplen, preferiblemente completamente, el criterio para la selección de aminoácido se describe aquí. La síntesis de los oligonucleótidos con el nucleótido seleccionado "degenera" en ciertas posiciones es bien conocido en la técnica, por ejemplo, el alcance TRIM (Knappek et al. (1999) J. Mol. Biol. 296:57-86); Garrard & Henner (1993) Gene 128:103). Tales conjuntos de oligonucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codón se pueden sintetizar utilizando sintetizadores de ácido nucleico comercial (disponible de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o se puede obtener comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizado que tiene un conjunto de codón particular incluirá típicamente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codón dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, como se utiliza de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación a una plantilla de ácido nucleico de dominio variable y también puede, pero no necesariamente, incluir sitios de restricción de enzima útiles para, por ejemplo, propósitos de clonación.

[0097] La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata et al. (1995 Protein Eng, 8(10): 1057-1062). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd tándem (V_H -CH 1 - V_{H1} -CH1) que, junto con polipéptidos de cadena liviana complementarios, forman un par de regiones de unión de antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

[0098] Como se utiliza aquí, "librería" se refiere a una pluralidad de secuencias de fragmento de anticuerpo o anticuerpo (por ejemplo, polipéptidos de la invención), o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, las secuencias son diferentes en la combinación de aminoácidos variantes que se introducen en estas secuencias de acuerdo con los métodos de la invención.

[0099] "Exhibición de fago" es una técnica por la cual los polipéptidos variantes se exhiben como proteínas de fusión a por lo menos una porción de proteína de recubrimiento en la superficie de fago, por ejemplo, fago filamentoso, partículas. Una utilidad de exhibición de fago se basa en el hecho que las colecciones grandes de variantes de proteínas aleatorizadas se pueden sortear rápidamente y eficientemente para aquellas secuencias que unen a un antígeno objetivo con afinidad alta. La exhibición de colecciones de proteína y péptido paguen fago se ha utilizado para detectar millones de polipéptidos para otras con propiedades de unión específicas. Se han utilizado métodos de exhibición de fago polivalentes para exhibir péptido aleatorizados pequeños y proteínas pequeñas a través de fusiones con el gen III o gen VIII de fago filamentoso. Wells y Lowman (1992) Curr. Opin. Struct. Biol. 3:355-362, y referencias citadas aquí. En una exhibición de fago monovalente, se fusiona una librería de proteína o péptido en un gen III o una porción del mismo, y se expresa en niveles bajos en la presencia de proteína III de gen tipo intacto ya que las partículas de fago exhiben una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de la avidez se reducen con relación al fago polivalente ya que la clasificación es sobre la base de afinidad de ligando intrínseca, y se utilizan vectores fagémidos, con manipulaciones de ADN simplificadas. Lowman y Wells (1991) Methods: A companion to Methods in Enzymology 3:205-0216.

[00100] Un "fagémido" es un vector plásmido que tiene un origen bacteriano de replicación, por ejemplo, ColEI, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido se puede utilizar en cualquier bacteriófago conocido, que incluye bacteriófago filamentoso y bacteriófago lambdoide. El plásmido también contendrá generalmente un marcador seleccionable para resistencia antibiótica. Los segmentos de ADN clonado en estos vectores se puede propagar como plásmidos. Cuando las células alojan estos vectores se proporcionan con todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación de los cambios de plásmido para la introducción de la replicación de círculo para generar copias monocatenarias del ADN de plásmido y partículas de fago empacadas. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Termal término incluye fagémidos, que contienen un gen de proteína de cubrimiento de fago o su fragmento ligado a un gen de polipéptido heterólogo como una fusión de gen de tal manera que el polipéptido heterólogo se exhibe en la superficie de la partícula de fago.

[00101] El término "vector de fago" significa una forma replicativa bicatenaria de bacteriofago que contiene un gen heterólogo y capaz de replicación. El vector de fago tiene un origen de fago de replicación y formación de partícula de fago. El fago es preferiblemente un bacteriófago filamentosos, tal como un fago M13, f1, fd, PD o su derivado, o un fago lambdoide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o su derivado.

[00102] Como se utiliza aquí, "posición accesible de disolvente" se refiere a una posición de un residuo de aminoácido en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de una fuente de fragmento de unión de anticuerpo o antígeno que se determina, con base en la estructura, conjunto de estructuras y/o estructura modelada del fragmento de unión de anticuerpo o antígeno, cuando está potencialmente disponible para acceso a disolvente y/o contacto con una molécula, tal como un antígeno específico a anticuerpo. Estas posiciones se encuentran típicamente en los CDR y en el exterior de la proteína. Las posiciones accesibles de disolvente de un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno, como se define aquí, se puede determinar utilizando cualquiera de un número de algoritmos conocidos en la técnica. En una realización, Se determinan las posiciones accesibles de disolvente utilizando coordenados de un dominio tridimensional de un anticuerpo, utilizando preferiblemente un programa de computador tal como el programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). También se pueden determinar las posiciones accesibles de disolvente utilizando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (1971) J. Mol. Biol. 55, 379 y Connolly (1983) J Appl. Cryst. 16, 548). La determinación de posiciones accesibles de disolvente se puede desarrollar utilizando el software adecuado para el modelamiento de proteína e información estructural tridimensional obtenida de un anticuerpo. El software que se puede utilizar para estos propósitos incluye el software SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). Generalmente, donde un algoritmo (programa) requiere un parámetro de tamaño de entrada de usuario, el "tamaño" de una sonda que se utiliza en el cálculo se establece en aproximadamente 1.4 Angstrom o más pequeño en radio. Adicionalmente, la determinación de regiones accesibles de disolventes y métodos de área utilizando software para computadores personales se han descrito por Pacios (1994) Comput. Chem. 18(4): 377-386.

[00103] Un "factor angiogénico o agente" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogenia, crecimiento celular endotelial, estabilidad de vasos sanguíneos, y/o vasculogenia, etc. Por ejemplo, factores angiogénicos, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia VEGF, PlGF, familia PDGF, familia de factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), ligandos

TIE (Angiopoyetinas), efrinas, ligando 4 como Delta 4 (DLL4), Del-1, factores de crecimiento de fibroblasto: ácido (aFGF) y básico (bFGF), Follistatina, factor que estimula la colonia de granulocito (G-CSF), factor de crecimiento de Hepatocito (HGF)/ factor de dispersión (SF), Interleukin-8 (IL-8), Leptina, Midkine, neurofilinas, factor de crecimiento Placental, factor de crecimiento de célula endotelial derivada de plaqueta (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaqueta, especialmente PDGF-BB o PDGFR-beta, Pleyotrofina (PTN), Progranulina, Proliferina, factor-alfa de crecimiento transformante (TGF-alfa), factor-beta de crecimiento transformante (TGF-beta), factor- alfa de necrosis de tumor (TNF-alfa), etc. También se incluiría factores que aceleran la curación de heridas, tal como hormona de crecimiento, factor I de crecimiento similar a insulina (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia, y TGF-alfa y TGF- beta. Ver, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit y Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179; Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556 {por ejemplo, Tabla 1 que enlista factores angiogénicos conocidos}; y, Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206.

[00104] Un "agente de anti-angiogenia" o "inhibidor de angiogenia" se refiere a una sustancia de peso molecular pequeño, un polinucleótido (que incluye, por ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi o siARN)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o sus proteínas de fusión, que inhiben la angiogenia, vasculogenia, o permeabilidad vascular indeseada, directamente o indirectamente. Se debe entender que el agente de anti-angiogenia incluye aquellos agentes que unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente de anti-angiogenia es un anticuerpo u otro antagonista para un agente angiogénico como se definió anteriormente, por ejemplo, anticuerpos para VEGF-A o para el receptor VEGF-A (por ejemplo, receptor KDR o receptor Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tal como Gleevec™ (Mesilato Imatinib), moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU 11248 (malato sunitinib), AMG706, o aquellos descritos en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2004/1 13304). Los agentes anti- angiogenia también incluyen inhibidores de angiogenia nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Ver, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit y Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179 (por ejemplo, Tabla 3 que enlista la terapia anti-angiogénica en melanoma maligno); Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556 (por ejemplo, la Tabla 2 enlista factores angiogénicos conocidos); y, Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206 (por ejemplo, La Tabla 1 enlista los agentes anti-angiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

- [00105] El término "VEGF" o "VEGF-A" como se utiliza aquí se refiere a factores de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos y se relacionan 121-, 189-, y 206- factores de crecimiento celular endotelial vascular humano de aminoácido, como se describe por Leung et al. (1989) Science 246:1306, y Houck et al. (1991) Mol. Endocrin, 5:1806, junto con sus formas procesadas y alélicas de ocurrencia natural. El término "VEGF" también se refiere a los VEGF de especies no humanas tal como ratón, rata, o primate. Algunas veces el VEGF de una especie específica se indica mediante términos tal como hVEGF para el VEGF humano, mVEGF para el VEGF de murino, etc.
- 10 El término "VEGF" también se utiliza para referirse a formas truncadas del polipéptido que comprende 8 a 109 aminoácidos o 1 a 109 del factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de tales formas de VEGF se puede identificar en la presente solicitud, por ejemplo, por "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" o "VEGF₁₆₅." Las posiciones de aminoácido para un VEGF nativo "truncado" se
- 15 enumeran según se indica en la secuencia VEGF nativa. Por ejemplo, la posición 17 de aminoácido (metionina) en VEGF nativo truncado también está en la posición 17 (metionina) en VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene afinidad de unión para los receptores KDR y Flt-1 comparable con VEGF nativo.
- 20 [00106] un "anticuerpo anti-VEGF " es un anticuerpo que une a VEGF con afinidad y especificidad suficiente. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención es el anticuerpo B20-4.1.1. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención es el anticuerpo B20-4.1.1RR. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se puede utilizar como un agente terapéutico en objetivar e interferir con
- 25 enfermedades o afecciones en donde se involucra la actividad VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF no se une usualmente a otros homólogos VEGF tal como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tal como PlGF, PDGF o bFGF.
- [00107] El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab (BV)," también conocido como "rhuMAb VEGF" o "AVASTIN[®]," es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta et al. (1997) Cáncer Res. 57:4593-4599. Este comprende regiones de estructura IgG1 humana mutada y regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF de murino A.4.6.1 que bloque la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente 93%
- 30 de la secuencia de aminoácido de Bevacizumab, que incluye la mayoría de las regiones de estructura, se deriva de IgG1 humano, y aproximadamente 7% de la secuencia se deriva del anticuerpo A4.6.1 de murino. El Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149,000 daltons y se glucosila.
- 35

[00108] El término "polipéptido serie B20" como se utiliza aquí se refiere a un polipéptido, que incluye un anticuerpo que une a los polipéptidos serie VEGF. B20 que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos derivados de una secuencia de anticuerpo B20 o un anticuerpo derivado B20 descrito en la Publicación Estadounidense No. 20060280747, la

5 Publicación Estadounidense No. 20070141065 y/o la Publicación Estadounidense No. 20070020267, el contenido de estas solicitudes de patentes se incorporan expresamente aquí como referencia. En una realización, el polipéptido serie B20 es B20-4.1 según se describe en la Publicación Estadounidense No. 20060280747, la Publicación Estadounidense No. 20070141065 y/o la Publicación Estadounidense No. 20070020267.

10

[00109] El término "B20-4.1.1 " como se utiliza aquí se refiere a que un anticuerpo que une a VEGF y comprende un anticuerpo en donde HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:2; HVR-H3 es SEQ ID NO:3; HVR-L1 es SEQ ID NO:4; HVR-L2 es SEQ ID NO:6; HVR-L3 es SEQ ID NO:7.

15

[00110] El término "B20-4.1.1RR" como se utiliza aquí se refiere a que un anticuerpo une a VEGF y comprende un anticuerpo en donde HVR-H1 es SEQ ID NO: 1; HVR-H2 es SEQ ID NO:2; HVR-H3 es SEQ ID NO:3; HVR-L1 es SEQ ID NO:5; HVR-L2 es SEQ ID NO:6; HVR-L3 es SEQ ID NO:7.

20

[00111] El término "G6-31 " como se utiliza aquí es uno de los polipéptidos serie G-6 según se describe en la Publicación Estadounidense No. 20060280747, la Publicación Estadounidense No. 20070141065 y/o la Publicación Estadounidense No. 20070020267. Otros polipéptidos serie G-6, según se describe en la Publicación Estadounidense No.

25 20060280747, la Publicación Estadounidense No. 20070141065 y/o la Publicación Estadounidense No. 20070020267 que incluye, pero no se limita a, G6-8 y G6-23.

30

[00112] El término "actividad biológica " y "biológicamente activo," con respecto a un polipéptido VEGF, se refiere a copropiedades físicas/químicas y funciones biológicas asociadas con VEGF.

35

[00113] Un "antagonista VEGF " se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con actividades VEGF que incluye, pero no se limita a, su unión a uno o más receptores VEGF. Los antagonistas VEGF incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-VEGF y sus fragmentos de unión a antígeno, moléculas de receptor y derivados que unen específicamente a VEGF que por lo tanto secuestra su unión a uno o más receptores, los anticuerpos del receptor anti-VEGF y antagonistas del receptor VEGF tal como inhibidores de molécula pequeña de las quinasas tirosina VEGFR. El término "antagonista VEGF," como se utiliza aquí, incluye específicamente moléculas, que

incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, otros polipéptidos de unión, péptidos, y moléculas pequeñas sin péptido, que unen a VEGF y son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con las actividades de VEGF. Así, el término "actividades VEGF" incluye específicamente actividades biológicas mediadas por VEGF (como se definió aquí anteriormente) de VEGF. En una realización, el antagonista VEGF es anticuerpo anti-VEGF B20-4.1.1. En todavía otra realización, el antagonista VEGF es anticuerpo anti-VEGF B20-4.1.1RR.

[00114] Como se utiliza aquí, "tratamiento" (y variaciones tal como "tratar" o "que trata") se refiere una intervención clínica en un intento para alterar el curso natural del individuo o célula a ser tratado, y se puede desarrollar por profilaxis o durante el curso de patología clínica. Los efectos deseables de tratamiento incluyen evitar la ocurrencia o recurrencia de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualesquier consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, evitar metástasis, reducir la velocidad de progresión de la enfermedad, alivio o paliación del estado de la enfermedad, y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, se utilizan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o hacer lenta la progresión de una enfermedad o trastorno.

[00115] Administración "crónica" se refiere la administración de los agentes en un modo continuo según cuando opone a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo extendido. Administración "Intermitente" es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, pero es cíclico en naturaleza.

[00116] Un "trastorno" condiciones cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento (por ejemplo, mamíferos quienes sufren de o necesitan profilaxis contra la angiogenia anormal (angiogenia excesiva, inapropiada o no controlada) o permeabilidad vascular). Esto incluye trastornos o enfermedades agudas o crónicas que incluye aquellas afecciones patológicas, que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a ser tratados aquí incluyen tumores benignos y malignos; malignidades linfoides y sin leucemias; y, en particular, metástasis de tumor (por ejemplo, cáncer).

[00117] Los términos "trastorno proliferativo de célula" y "trastorno proliferativo" se refiere a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo de célula es cáncer.

[00118] "Tumor," como se utiliza aquí, se refiere a todo el crecimiento celular neoplásico y la proliferación, si es maligno o benigno, y todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. El términos "cáncer," "canceroso," "trastorno proliferativo de célula," "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente exclusivos como se refiere aquí.

5

[00119] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refiere a o describe la afección fisiológica en mamífero que se caracteriza típicamente mediante crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Más particular ejemplos de tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de célula epidermoide, cáncer de pulmón (que incluye cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma del pulmón escamoso), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer de estómago o gástrico (que incluye cáncer gastrointestinal y cáncer estromal gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer renal o de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroide, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de esparcido superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginoso acral, melanomas nodulares, así como también Linfoma de célula B (que incluye linfoma no-Hodgkin de grado bajo/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL) NHL; NHL de grado intermedio/folicular; NHL grado intermedio difuso; NHL de alto grado inmunoblástico; NHL de alto grado linfoblástico; NHL de célula no dividible pequeño de alto grado; NHL de enfermedad de masa; linfoma de célula de manto; linfoma relaciona con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); Leucemia de célula capilar; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo post-transplante (PTLD), así como también proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como aquel asociado con tumores de cerebro), y Síndrome de Meigs.

[00120] Un "individuo," "sujeto," o "paciente" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja (tal como vacas), animales de deporte, mascotas (tal como gatos, perros, y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un humano.

[00121] El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma para permitir la actividad biológica del ingrediente activo a ser efectivo, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos en un sujeto al que se administraría la formulación. Tales formulaciones pueden ser estériles.

[00122] Una formulación "estéril" es aséptica o libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

[00123] Una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones o durante periodos necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

[00124] Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una sustancia/molécula de la invención puede variar de acuerdo con factores tal como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva abarca una cantidad en la que cualesquier perjudiciales o tóxicos de la sustancia/molécula se ponderan por los efectos terapéuticamente benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, debido a que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes de o al inicio de la etapa de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva sería menor de la cantidad terapéuticamente efectiva.

[00125] La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

[00126] "Portadores" como se utiliza aquí incluyen portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizadores que no son tóxicos para la célula o el mamífero a ser expuesto en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente el portador fisiológicamente aceptable es una solución amortiguada de pH acuoso. Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen amortiguantes tal como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluye ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como povidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluye glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; alcoholes de azúcar tal como manitol o sorbitol; counteriones formadores de sal tal como sodio; y/o tensoactivos no iónicos tal como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

[00127] Una "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para el suministro de un fármaco (tal como un

polipéptido VEGF o su anticuerpo) a un mamífero. Los componentes de la liposoma se dispone comúnmente en una formación bicapa, similar a la disposición de lípido de membranas biológicas.

5 [00128] El término "composición antineoplásica" se refiere a una composición útil en tratar el cáncer que comprende por lo menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, "agente anti- cáncer." Ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anti-cáncer) incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores de crecimiento, agente citotóxicos, agentes utilizados en terapia de radiación, agentes anti-angiogenia, 10 agentes apoptóticos, agentes anti- tubulina, y otros agentes para tratar el cáncer, tal como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti- CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor tirosina quinasa), inhibidor HER1 /EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™), inhibidores de factor de crecimiento derivados de plaqueta (por ejemplo, Gleevec™ (Mesilato Imatinib)), un 15 inhibidor COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que unen a uno o más de los siguientes objetivos ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF receptor(s), TRAIL/ Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. también se incluyen sus combinaciones en la invención.

20

[00129] El término "agente citotóxico" como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o origina muerte o destrucción celular. El término está destinado a incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, ¹³¹I, ¹²⁵I, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por 25 ejemplo, metotrexato, adriamicina, vinca alcaloides (vincristina, vinblastina, etoposida), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y sus fragmentos tal como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tal como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de bacterias, hongos, plantas u origen animal, que incluye fragmentos y/o sus variantes, y los 30 varios agentes antineoplásicos o antineoplásico descritos adelante. Otros agentes citotóxicos se describen adelante. Un agente tumoricida origina la destrucción de células de tumor.

[00130] Una "toxina" substancias cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial 35 en el crecimiento o proliferación de una célula.

[00131] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tal como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos alquilo tal como busulfan, improsulfan

y pipsulfan; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluye altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-1 1 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC- 1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tal como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostazas uracilo; nitrosoureas tal como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tal como los antibióticos enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (ver, por ejemplo, Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl, 33: 183-186 (1994))); CDP323, un inhibidor integrina oral alfa-4; dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; así como también cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos enedina cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L- norleucina, doxorubicina (que incluye ADRIAMICINA®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposoma doxorubicina HCl (DOXIL®), liposomal doxorubicin TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal pegilada (CAEL YX®), y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tal como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); combretastatina; análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; pirógenos tal como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactono; anti-adrenales tal como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glicosida aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina;

diaziquona; elfornitina; acetato eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tal como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural
 5 Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2'- trichlorotrietilamina; tricotecenes (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridina A y anguidina); uretan; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitocina; arabinosida ("Ara- C");
 10 tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartícula construida por ingeniería de albumina de paclitaxel (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes platino tal como cisplatina, oxaliplatina (por ejemplo, ELOXATIN®), y carboplatina; vincas, que evitan la polimerización de tubulina de microtúbulos formados, que incluye vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina
 15 (NAVELBINE®); etoposida (VP- 16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorin; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tal como ácido retinoico, que incluye bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tal como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico /zoledronato
 20 (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo citocina nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos anticodificantes, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tal como, por ejemplo, PKC-alpha, Raf, H-Ras, y receptor del factor de
 25 crecimiento epidérmico (EGF-R) (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)); y VEGF-A que reduce la proliferación celular; vacunas tal como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia de gen, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer);
 30 perifosina, inhibidor COX-2 (por ejemplo , celecoxib o etoricoxib), inhibidor proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (RI 1577); orafenib, ABT510; inhibidor Bcl-2 tal como oblimersen sodio (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores EGFR; inhibidores tirosina quinasa; inhibidores quinasa serina-treonina tal como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores farnesiltransferasa tal como
 35 lonafarnib (SCH 6636, SARAS AR™); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores; así como también combinaciones de dos o más de los anteriores tal como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatina (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y

leucovorina, y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como también combinaciones de dos o más de los anteriores.

[00132] Los agentes quimioterapéuticos según se define aquí incluyen "agentes anti-hormonales" o "terapéuticos endocrino" que actúan para regular, reducir, bloquear, o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Ellos mismos pueden ser hormonas, que incluye, pero no se limita a: anti-estrógenos y moduladores del receptor de estrógeno selectivo (SERM), que incluye, por ejemplo, tamoxifen (que incluye NOLVADEX® tamoxifen), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifen, trioxifeno, keoxifeno, LYI 17018, onapristona, y FARESTON- toremifeno; inhibidores aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tal como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato megestrol, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®; y anti-andrógenos tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como también troxacitabina (un análogo citocina nucleósido 1',3'-dioxolano); oligonucleótidos anticodificantes, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tal como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tal como un inhibidor de expresión VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de expresión HER2; vacunas tal como vacunas de terapia de gen, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor 1 de topoisomerasa LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina y Esperamicinas (ver Patente Estadounidense No. 4,675,187), y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como también combinaciones de dos o más de los anteriores.

[00133] Un "agente inhibidor de crecimiento" cuando se utiliza aquí se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa VEGF) in vitro o in vivo. Así, el agente inhibidor de crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa VEGF) en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores de crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente de la fase S), tal como agentes que inducen detención G1 y detención de fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores topoisomerasa II tal como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen el G1 también se dividen en detención de fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tal como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede

encontrar información adicional en Mendelsohn y Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (W. B. Saunders, Philadelphia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados del nuevo árbol tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del árbol de tejo Europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamble de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos al evitar la despolimerización, que resulta en la inhibición de mitosis en las células.

[00134] La "patología" de una enfermedad incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Para el cáncer, esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, la liberación de citoquinas u otros productos secretores en niveles anormales, supresión o alteración de respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

[00135] El término "profármaco" como se utiliza en esta solicitud se refiere a una forma de precursor o derivado de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células de tumor comparado con el fármaco padre y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertido en la forma padre más activa. Ver, por ejemplo, Wilman (1986) "Prodrugs in Cáncer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375- 382, 615th Meeting Belfast y Stella et al. (1985). "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247- 267, Humana Press. Los profármacos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados de D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β -lactam, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitocina y otros profármacos 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que se puede derivar en una forma de profármaco para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

[00136] Una "molécula pequeña" se define aquí por tener un peso molecular por encima de aproximadamente 500 Daltons.

[00137] "Purificado" significa que una molécula está presente en una muestra en una concentración de por lo menos 95% en peso, o por lo menos 98% en peso de la muestra en la que está contenida.

5 [00138] Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de por lo menos otra molécula de ácido nucleico con el que este se asocia ordinariamente, por ejemplo, en su ambiente natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye adicionalmente una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan ordinariamente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido
10 nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

[00139] El término "vector," como se utiliza aquí, está destinado a referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que este se liga. Un tipo del
15 vector es un "plásmido," que se refiere a un ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar los segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que ellos se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que
20 tienen un origen de replicación bacteriano y vectores mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona luego de la introducción de la célula anfitriona, y por lo tanto se replican junto con el genoma. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que ellos se ligan operativamente. Tales vectores se refieren aquí
25 como "vectores de expresión recombinante," o simplemente, "vectores de expresión." En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se puede utilizar intercambiablemente como el plásmido que es la forma más comúnmente utilizada del vector.

30 [00140] "Polinucleótido," o "ácido nucleico," como se utiliza intercambiablemente aquí, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser deoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero
35 mediante polimerasa de ADN o ARN o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tal como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura de nucleótido se puede impartir alterantes o después de ensamblar del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes sin nucleótido. Un polinucleótido puede comprender

modificaciones hechas después de síntesis, tal como conjugación en una marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "mayúsculas," sustitución de uno o más de nucleótidos de ocurrencia natural con un análogo, modificaciones de internucleótido tal como, por ejemplo, aquellos con ligados no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con ligados cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen grupos funcionales pendientes, tal como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, ply-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantates, aquellos con ligados modificados (por ejemplo, ácido nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como también formas no modificadas de los polinucleótidos. Adicionalmente, cualquiera de los grupos hidroxilo ordinariamente presentes en los azúcares se pueden reemplazar, por ejemplo, mediante grupos fosfonato, grupos fosfato, protegido por grupos protectores estándar, o activado para preparar ligados adicionales para nucleótidos adicionales, o se puede conjugar con soportes sólidos o semi-sólidos. El Terminal OH 5' y 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o grupos funcionales de taponado orgánico de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivar de grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o deoxiribosa que se conocen generalmente en la técnica, que incluye, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'- azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclicos, azúcares anoméricos α , azúcares epiméricos tal como arabinosa, xilosas o azúcares piranosa, lixosas, azúcares furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos, y análogos nucleósidanálogos básicos tal como metil ribosida. Uno o más ligados fosfodiéster que se pueden reemplazar mediante grupos de ligado alternativos. Estos grupos de ligado alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en donde se reemplaza el fosfato por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO, o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un ligado éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los ligados en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente aplica a todos los polinucleótidos referidos aquí, que incluye ARN y ADN.

[00141] "Oligonucleótido," como se utiliza aquí, generalmente se refiere polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente polinucleótidos sintéticos que son generalmente, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos en longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivos. La descripción anterior para los polinucleótidos es igual y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

[00142] "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácido" con respecto a la secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácido en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considera cualesquier sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. La alineación para propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácido se puede alcanzar en varias formas que están dentro de la experticia de la técnica, por ejemplo, utilizando software de computador disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para las secuencias de alineación, que incluye cualesquier algoritmos necesarios para alcanzar la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que son comparadas. Para propósitos aquí, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácido se generan utilizando el programa de computador para comparación de secuencia ALIGN-2. El programa de computador para comparación de secuencia ALIGN-2 se autoriza por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación del usuario en el U.S. Copyright Office, Washington D. C, 20559, donde se registra bajo U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para uso en un sistema de operación UNIX, preferiblemente digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

[00143] En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencia de aminoácido, el % de identidad de secuencia de aminoácido de una secuencia de aminoácido dada A a, con, o contra una secuencia de aminoácido dada B (que alternativamente se puede nombrar como una secuencia de aminoácido dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácido para, con, o contra una secuencia de aminoácido dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y ,

donde X es el número de residuos de aminoácido clasificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencia ALIGN-2 en el que la alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que la longitud de la secuencia de aminoácido A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácido B, el % de identidad de secuencia de aminoácido de A a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácido de B a A. A menos que se

indique específicamente otra cosa, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácido utilizados aquí se obtienen según se describe en el párrafo inmediatamente precedente utilizando el programa de computador ALIGN-2.

5 [00144] La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante ligada operablemente en un organismo anfitrión particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión de ribosoma. Las células eucarióticas se conocen por utilizar promotores, señales
10 de poliadenilación y mejoradores.

[00145] El ácido nucleico se "une operablemente" cuando este se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o líder secretor se une operablemente al ADN para un polipéptido si este se expresa
15 como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador se liga operablemente a una secuencia codificante que afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se liga operablemente a una secuencia codificante si esta se posiciona con el fin de facilitar traducción. Generalmente, "ligado operablemente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el
20 caso de un líder secretor, contiguos y en fase de lectura. Sin embargo, los mejoradores no son contiguos. El ligado se lleva a cabo mediante ligado de los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se utilizan adaptadores de oligonucleótido sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

25 [00146] Como se utiliza aquí, las expresiones "célula," "estirpe celular," y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y todas tales designaciones incluyen progenia. Así, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos se derivan de estos con respecto al número de transferencias. También se entiende que toda la progenia no puede ser precisamente idéntica en contenido de ADN,
30 debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenia mutante que tiene la misma función o actividad biológica cuando se detecta en la célula originalmente transformada. Cuando se destinan designaciones distintas, será claro del contexto.

[00147] El término "concurrentemente" se utiliza aquí para referirse a la administración de
35 dos o más agentes terapéuticos, donde por lo menos parte de la administración se sobrepone en el tiempo. De acuerdo con lo anterior, la administración concurrente incluye un régimen de dosificación cuando la administración de uno o más agentes continúa después de discontinuar la administración de uno o más de otros agentes.

[00148] "Recurrencia del Cáncer" aquí se refiere a un retorno del cáncer luego de tratamiento. En una realización, la recurrencia del cáncer incluye regreso del cáncer en la mama, así como también recurrencia distante, cuando el cáncer regresa fuera de la mama.

5

Composiciones de la invención

[00149] La invención abarca realizaciones de anticuerpo y polinucleótido aislado. En una realización, se purifica un anticuerpo anti-VEGF.

10

[00150] Esta invención también abarca composiciones, que incluye composiciones farmacéuticas, que comprende un anticuerpo anti-VEGF; y polinucleótidos que comprende secuencias que codifican un anticuerpo anti-VEGF. Como se utiliza aquí, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que unen a VEGF, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden las secuencias que codifican uno o más anticuerpos que unen a VEGF. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente portadores adecuados, tal como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluye amortiguantes, que son bien conocidos en la técnica.

15

20

[00151] En una realización, los anticuerpos anti-VEGF de la invención son monoclonales. En todavía otra realización, los anticuerpos anti-VEGF son policlonales. También se abarcan dentro del alcance de la invención los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂ de los anticuerpos anti-VEGF proporcionados aquí. Estos fragmentos de anticuerpo se pueden crear por medios tradicionales, tal como digestión enzimática, o se pueden generar mediante técnicas recombinantes. Tales fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para el diagnóstico y los propósitos establecidos adelante. En una realización, un anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo quimérico, humanizado, o humano.

25

30

[00152] Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de ocurrencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Así, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

35

[00153] Los anticuerpos monoclonales de ejemplo derivados de una colección de fago se proporcionan aquí y se describen en el Ejemplo 1. Aquellos anticuerpos se designan B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR. Las secuencias de los dominios de cadena pesada y liviana de B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR se muestran en las Figuras 1 y 6-9.

[00154] Para la detección de anticuerpos que unen a un epítopo particular en el antígeno de interés, se puede desarrollar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como aquel descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Alternativamente, el mapeo de epítopo, por ejemplo, según se describe en Champe et al. (1995) J Biol. Chem. 270:1388-1394, se puede desarrollar para determinar si el anticuerpo une un epítopo de interés. Se proporcionan adelante realizaciones de ejemplo adicionales de anticuerpos anti-VEGF.

10 **Realizaciones específicas de anticuerpos anti-VEGF**

[00155] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende:

- 15 (i) una secuencia HVR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 ; (ii) una secuencia HVR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:2;
- (iii) una secuencia HVR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3.
- (iv) una secuencia HVR-L1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:4.
- (v) una secuencia HVR-L2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:6.
- (vi) una secuencia HVR-L3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:7.

20

[00156] En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende:

- (i) una secuencia HVR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 ;
- (ii) una secuencia HVR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:2;
- 25 (iii) una secuencia HVR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3. (iv) una secuencia HVR-L1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5.
- (v) una secuencia HVR-L2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:6.
- (vi) una secuencia HVR-L3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:7.

30 [00157] La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs: 1 a 7 se enumeran con respecto al HVR individual (es decir, H1, H2 o H3) según se indica en la Figura 1, la numeración es consistente con el sistema de numeración Kabat como se describe aquí.

[00158] En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden secuencia HVR de cadena pesada como se describe en la Figura 1.

35

[00159] Algunas realizaciones de los anticuerpos de la invención comprenden un dominio variable de cadena liviana del anticuerpo 4D5 humanizado (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (también referido en la Patente

Estadounidense No. 6,407,213 y Lee et al. J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93) como se describe en la SEQ ID NO:39 adelante.

5 [00160] ¹Asp He Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr He Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu He Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu He Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO:39) (se destacan los residuos HVR).

10 [00161] En una realización, la secuencia de dominio variable de cadena liviana huMAb4D5-8 se modifica en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (Asn, Arg y His según se indica en negrilla/cursiva anterior, respectivamente). En una realización, la secuencia huMAb4D5-8 modificada comprende Ser en la posición 30, Gly en la posición 15 66 y/o Ser en la posición 91. De acuerdo con lo anterior, en una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia descrita en la SEQ ID NO:40 adelante:

20 [00162] ¹Asp He Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr He Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Tip Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu He Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu He Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO:40) (se destacan los residuos HVR)

25 [00163] Los residuos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 se indican en negrilla/cursiva anterior.

30 [00164] Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia de dominio variable de estructura adecuada, que proporciona la actividad de unión al VEGF se retiene sustancialmente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia consensus de estructura de cadena pesada subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consensus de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones 35 de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden las secuencias de estructura de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (también referido en la Patente Estadounidense Nos. 6,407,213 & 5,821,337, y Lee et al, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93). En una realización, estos anticuerpos comprenden

adicionalmente una secuencia consensus de estructura de cadena liviana humana. En una realización, estos anticuerpos comprenden las secuencias HVR de cadena liviana de huMAb4D5-8 según se describe en Patente Estadounidense Nos. 6,407,213 & 5,821,337). En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de dominio variable de cadena liviana de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (también referido en la Patente Estadounidense Nos. 6,407,213 & 5,821,337, y Lee et al, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93).

[00165] En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde la secuencia de estructura comprende las secuencias de SEQ ID NOS:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, y/o 26 (Figuras 2a y 2b), y las secuencias HVR H1, H2 y H3 son las SEQ ID NOS: 1, 2 y/o 3, respectivamente. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana, en donde la secuencia de estructura comprende las secuencias de SEQ ID NOS:27, 28, 29 y/o 30 (Figure 3), la secuencia HVR L1 es SEQ ID NOS:4 o 5, la secuencia HVR L2 es SEQ ID NO:6, y la secuencia HVR L3 es SEQ ID NO:7.

[00166] En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:43. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO:44 o 45. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:43 y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO:45. En todavía otra realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:44 y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO:45.

[00167] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compete con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente para la unión a VEGF. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que une al mismo epítipo en VEGF como cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Fragmentos de Anticuerpo

[00168] La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo se pueden generar por medios tradicionales, tal como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias existen ventajas al utilizar fragmentos de anticuerpo, que anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los

fragmentos permite depuración rápida, y puede liderar mejor acceso a los tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, ver Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

5 [00169] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan por vía de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente
10 mediante células anfitrionas recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv todos se pueden expresar en y se secretan de E. coli, permitiendo así la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las colecciones de fago de anticuerpo discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de E. coli y
15 se acoplan químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163- 167 (1992)). De acuerdo con otra investigación, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de célula anfitriona recombinante. El fragmento Fab y F(ab')₂ con residuos de epítipo que unen al receptor salvaje que comprende vida útil in vivo incrementada se describen en la Patente Estadounidense No. 5,869,046. Otras
20 técnicas para la producción de los fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el practicante experto. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Ver WO 93/16185; Patente Estadounidense Nos. 5,571,894; y 5,587,458. Los Fv y scFv son solo las especies con sitios de combinación intacto que están desprovistas de regiones constantes; así, ellos pueden ser adecuados para la unión no
25 específica reducida durante uso in vivo. Las proteínas de fusión scFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el terminal amino o el terminal carboxi de un scFv. Ver Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,641,870, por ejemplo. Tales anticuerpos lineales pueden ser
30 anticuerpos monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

[00170] La invención abarca anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica varios
35 métodos para anticuerpos no humanos humanizantes. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácido introducidos en una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos frecuentemente se refieren a residuos "importes", que se toman típicamente de un dominio variable "importe". La humanización se puede desarrollar esencialmente siguiendo el método de Winter y

colaboradores (Jones et al. (1986) Nature 321 :522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 22,2:323-321; Verhoeyen et al. (1988) Science 239: 1534-1536), mediante secuencias de región hipervariable sustituyente para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con lo anterior, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente Estadounidense No. 4,816,567) en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen mediante sitios análogos en anticuerpos roedor.

[00171] La elección de dominios humanos variables, livianos y pesados, a ser utilizados en la elaboración de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método así llamado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se detecta contra la colección completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia humana que es más cerrada que del roedor luego se acepta como la estructura humana para el anticuerpo humanizado. Ver, por ejemplo, Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia e/ α . (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro método utiliza una estructura particular derivada de la secuencia consensus de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las cadena pesada o liviana. La misma estructura se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes. Ver, por ejemplo, Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J Immunol, 151:2623.

[00172] Es generalmente adicionalmente deseable que los anticuerpos se puede humanizar con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar esta meta, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parental y varios productos humanizados conceptuales utilizando tres modelos dimensionales de las secuencias humanizadas y parentales. Están comúnmente disponibles los modelos de inmunoglobulina tridimensional y son familiares para aquellos expertos en la técnica. Los programas de computador están disponibles para ilustrar y exhibir estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionada. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unir su antígeno. De esta forma, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar del receptor y se alcanzan secuencias importes de tal manera que el anticuerpo deseado característico, tal como afinidad incrementada para el

antígeno objetivo. En general, los residuos de región hipervariable se involucran directamente y más sustancialmente en influenciar la unión de antígeno.

Anticuerpos humanos

5

[00173] Los anticuerpos humanos de la invención se pueden construir al combinar secuencias de dominio variable clon Fv seleccionadas de colecciones de exhibición de fago derivado de humano con secuencias de dominio constante humano según se describió anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden hacer mediante el método de hibridoma. Las estirpes celulares heteromieloma de ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor, J Immunol, 133: 3001 (1984); Brodeur et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al, J. Immunol., 147: 86 (1991).

10

15

[00174] Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, luego de inmunización, para producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes de línea germinal y quimérica resulta en inhibición completa de la producción de anticuerpo endógena. La transferencia del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana se dispone en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de los anticuerpos humanos luego de exposición a antígeno. Ver, por ejemplo, Jakobovits et al, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann et al, Year in Immunol., 7: 33 (1993).

20

25

[00175] La mezcla génica también se puede utilizar para derivar anticuerpos humanos de no humanos, por ejemplo roedores, anticuerpos, en donde el anticuerpo humano tiene afinidades similares y especificidades para el anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se llama "impresión de epítipo," la región variable de cadena pesada o liviana de un fragmento no humano obtenido por técnicas de exhibición de fago como se describe aquí se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras Fab o scFv de cadena humana/cadena no humana. La selección con antígeno resulta en el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana en donde la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido luego de la remoción de la cadena no humana correspondiente en el clon de exhibición de fago primario, es decir los

30

35

gobiernos de epítopo (impresiones) la elección del patrón de cadena humana. Cuando se repite el proceso con el fin de reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (ver PCT WO 93/06213 publicado en Abril 1, 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto CDR, esta técnica proporciona completamente anticuerpos humanos, que no tienen residuos FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

[00176] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen afinidades de unión durante por lo menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para el VEGF y el otro es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos puede unir a dos diferentes epítopos de VEGF. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos para las células que expresan VEGF. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a VEGF y un brazo que une un agente citotóxico, tal como, por ejemplo , saporina, anti-interferón- α , vinca alcaloide, cadena ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radioactivo. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o los fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[00177] Se conocen en la técnica métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co- expresión de dos pares de cadena liviana-cadena pesada de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305: 537 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que usualmente se hace mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicado, y los rendimientos de producto son bajos. Se describen procedimientos similares en la WO 93/08829 publicada en Mayo 13, 1993, y en Traunecker et al. , EMBO J, 10: 3655 (1991).

[00178] De acuerdo con un alcance diferente, los dominios de anticuerpo variables con las especificidades de unión deseada (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones la bisagra, CH2, y CH3. En ciertas

realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de cadena liviana, está presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena liviana de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo anfitrión adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando proporciones no iguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o todas las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales resulta en altos rendimientos o cuando las proporciones no son de significancia particular.

[00179] En una realización de este método, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena liviana-cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encuentra que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no esperada, como la presencia de una cadena liviana de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica proporcionada para facilitar la vía de separación. Este método se describe en la WO 94/04690. Para detalles adicionales de generar anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh et al, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

[00180] De acuerdo con otro método, la interface entre un par de moléculas de anticuerpo se pueden construir por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interface comprende por lo menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interface de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptofan). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar para las cadenas laterales grandes se crean en la interface de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales de aminoácido largas con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tal como homodímeros.

[00181] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugado". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede

acoplar a la avidina, la otra a la biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para células de sistema inmune objetivo en células indeseadas (Patente Estadounidense No. 4,676,980), y para el tratamiento de la infección de VIH (WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden hacer utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Patente Estadounidense No. 4,676,980, junto con un número de técnicas de reticulación.

[00182] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de los fragmentos de anticuerpo también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos utilizando ligado químico. Brennan et al, Science, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se dividen proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en la presencia de la arsenita de sodio de agente complejante ditiol para estabilizar ditiolos vicinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados luego se convierten a derivados tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB luego se reconvierte en el Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de las enzimas.

[00183] El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de E. coli, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al, J. Exp. Med. , 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula $F(ab')_2$ de anticuerpo completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secreta separadamente de E. coli y se somete a acoplamiento químico directo in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado es capaz de unir a las células que sobreexpresan el receptor HER2 y células T humanas normales, así como también inicia la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumor de mama humana.

[00184] También se han descrito varias técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligan a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de gen. Los homodímeros de anticuerpo se reducen en la región de bisagra para formar monómeros y luego se reoxidan para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La

tecnología "dianticuerpo" descrita por Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar los fragmentos biespecíficos de anticuerpo. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) mediante un ligador que es muy corto para permitir la formación de pares entre los dos dominios de la misma cadena. De acuerdo con lo anterior, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejar con los dominios de complementariedad VL y VH de otro fragmento, formando por lo tanto dos sitios de unión a antígeno. También se ha reportado otra estrategia para elaborar fragmentos biespecíficos de anticuerpo mediante en uso de los dímeros de cadena única Fv (sFv). Ver Gruber et al, J. Immunol, 152:5368 (1994).

[00185] Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al J. Immunol. 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

[00186] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente mediante una célula que expresa un antígeno al que une los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptido del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste de) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más terminales amino de sitios de unión a antígeno para la región Fc. En ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste de) tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En tal una realización, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste de) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena de polipéptido (por ejemplo, dos cadenas de polipéptido), en donde las cadenas de polipéptido comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, las cadenas de polipéptido pueden comprender VDI-(XI)_n -VD2-(X2)_n -Fc, en donde VDI es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de una región Fc, XI y X2 representa un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, las cadenas de polipéptido pueden comprender: VH-CHI -ligador flexible - VH-CHI- cadena de región Fc; o VH-CHI -VH-CHI -Cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente aquí puede comprender adicionalmente por lo menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena liviana. El anticuerpo multivalente

aquí, por ejemplo, puede comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena liviana. Los polipéptidos de dominio variable de cadena liviana contemplados aquí comprenden una dominio de variable de cadena liviana y, opcionalmente, comprende adicionalmente un dominio CL.

5

Anticuerpos de dominio único

[00187] En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena de polipéptido única que comprende toda o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio de variable de cadena liviana de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo humano de dominio único (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 6,248,516 BI). En una realización, un anticuerpo de dominio único consiste de todo o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

Variantes de anticuerpo

[00188] En algunas realizaciones, se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácido de los anticuerpos descritos aquí. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácido del anticuerpo se pueden preparar al introducir cambios apropiados en la secuencia de nucleótido que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis de péptido. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácido del anticuerpo. Se puede hacer cualquier combinación de eliminación, inserción, y sustitución para arribar en la construcción final, dado que el producto final posee las características deseadas. Se pueden introducir alteraciones de aminoácido en la secuencia de aminoácido del anticuerpo objeto al momento que se hace la secuencia.

30

[00189] Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que prefieren ubicaciones para mutagenia se llama "mutagenia de exploración de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. Aquí, un residuo o grupo de residuos objetivo se identifican (por ejemplo, residuos cargados tal como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) y reemplazados por un aminoácido cargado negativamente o neutro (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas ubicaciones de aminoácido demuestran sensibilidad funcional para las sustituciones luego se refinan al introducir adicionalmente u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una

35

variación de secuencia de aminoácido se predetermina, la naturaleza de la mutación per se no se necesita predeterminar. Por ejemplo, para analizar el desarrollo de una mutación en un sitio dado, exploración aleatoria o mutagenia aleatorizada se conduce en un codón o región objetivo y se detectan las inmunoglobulinas deseadas para la actividad deseada.

5

[00190] Las inserciones de la secuencia de aminoácido incluyen fusiones de terminal amino- y/o carboxilo que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cientos o más residuos, así como también inserciones intrasecuencia de únicos o múltiples residuos de aminoácido. Ejemplos de inserciones de terminal incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo de terminal N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al terminal N- o C- del anticuerpo para una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la vida útil del suero del anticuerpo.

10

15

[00191] En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para incrementar o reducir el grado al que se glucosila el anticuerpo. La glucosilación de polipéptidos se liga típicamente a N u O. El ligado a N se refiere a la adhesión de un grupo funcional de carbohidrato para la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X -treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para adhesión enzimática del grupo funcional carbohidrato para la cadena lateral asparagina. Así, la presencia de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la adhesión de uno de los azúcares N- acilgalactosamina, galactosa, o xilosa para un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

20

25

[00192] La adición o eliminación de los sitios de glucosilación para el anticuerpo se lleva a cabo convenientemente al alterar la secuencia de aminoácido de tal manera que uno o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación ligados a N) se crea o se remueve. La alteración también se puede hacer mediante la adición, eliminación, o sustitución de uno o más residuos serina o treonina para la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

30

35

[00193] Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato adherido a este se puede alterar. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido ramificado, bcatenario que se adhiere generalmente por un ligado N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright et al. (1997) TIBTECH 15:26-32. El oligosacárido puede incluir varios

carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido sialílico, así como también una fucosa adherida a GlcNAc en la "corriente" de la estructura de oligosacárido bicatenario. En algunas realizaciones, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención se pueden hacer con el fin de crear
5 variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

[00194] Por ejemplo, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa adherida (directamente o indirectamente) a una región Fc. Tales variantes pueden tener función ADCC mejorada. Ver, por ejemplo,
10 Publicación de Patente Estadounidense Nos. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ejemplos de publicaciones se relacionan a variantes de anticuerpo "defucosiladas" o "deficientes de fucosa" que incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US
15 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031 140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane- Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de estirpes celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen Lee 13 células CHO deficientes en fucosilación de proteína (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545
20 (1986); US 2003/0157108 Al, Presta, L; y WO 2004/056312 Al, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 1 1), y estirpes celulares transgénicas, tal como gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO transgénicas (ver, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

[00195] Las variantes de anticuerpo se proporcionan adicionalmente con oligosacáridos divididos, por ejemplo, en los que un oligosacárido bicatenario se adhiere a la región Fc del anticuerpo se divide por GlcNAc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Ejemplos de tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al); Patente Estadounidense No. 6,602,684 (Umana et al); y US 2005/0123546 (Umana et al). También se proporcionan variantes de anticuerpo con por lo menos un residuo galactosa en el oligosacárido adherido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Se describen tales variantes de anticuerpo, por ejemplo, en WO
30 1997/30087 (Patel et al); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).
35

[00196] En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácido que mejoran adicionalmente ADCC, por ejemplo, las sustituciones en posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de los

residuos). Tales sustituciones pueden ocurrir en combinación con cualquiera de las variaciones descritas anteriormente.

[00197] En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que hacen a este un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la vida útil del anticuerpo in vivo es importante todavía en ciertas funciones efectoras (tal como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades Fc del anticuerpo se miden para asegurar que solo se mantienen las propiedades deseadas. Los ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo se pueden conducir para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión del receptor Fc (FcR) se pueden conducir para asegurar que el anticuerpo carece de unión FcγR (por lo tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero retiene la capacidad de unión FcRn. Las células principales para mediar células ADCC, NK, expresan solo FcγRIII, aunque los monolitos expresan la expresión de FcγRI, FcγRII y FcγRIII. FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Ejemplos no limitantes de ensayos in vitro para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente Estadounidense No. 5,500,362 (ver, por ejemplo Hellstrom, I., et al Proc. Nat 7 Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., Proc. Nat 'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (ver Bruggemann, M. et al, J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987)). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayo no radioactivos (ver, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radioactiva ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (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 tal como aquel descrito en Clynes et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión Clq para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir Clq y carece de actividad CDC. Para evaluar la activación complementaria, se puede desarrollar un ensayo CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Métodos 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al, Blood 101 :1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738- 2743 (2004)). La unión FcRn y depuración in vivo /determinaciones de vida útil también se puede desarrollar utilizando métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

[00198] Se proporcionan otras variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácido. Los sitios de interés para mutagenia de sustitución incluyen las regiones

hipervariables, pero también se contemplan alteraciones FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo en encabezado de "sustituciones preferidas." Se proporcionan cambios más sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente adelante en referencia a las

5 clases de aminoácido. Las sustituciones de aminoácido se pueden introducir en un anticuerpo de interés y los productos se detectan, por ejemplo, para una actividad deseada, tal como unión de antígeno mejorada, inmunogenicidad reducida, ADCC o CDC mejorada, etc.

10 **TABLA 1**

Residuo Original	Sustituciones de Ejemplo	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

Residuo Original	Sustituciones Ejemplo	Sustituciones preferidas
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)	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; Norleucina	Leu

[00199] Las modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo se pueden llevar a cabo al seleccionar sustituciones que afectan la estructura de la estructura del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) la masa de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (in A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) No polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), He (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polar no cargado: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácido: Asp (D), Glu (E)

(4) básico: Lys (K), Arg (R), His(H)

- 5 Alternativamente, se pueden dividir residuos de ocurrencia natural en grupos con base en propiedades de cadena lateral común:

(1) hidrófobo: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

- 10 (3) ácido: Asp, Glu; (4) básico: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

- 15 [00200] Las sustituciones no conservadoras requieren el intercambio de un miembro de una de estas clases para otra clase. Tales residuos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservadora o, en los sitios restantes (por ejemplo, no conservados).

- 20 [00201] Un tipo de variantes de sustitución involucra sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo padre (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional habrán modificado (por ejemplo, mejorado) las propiedades biológicas relacionadas al anticuerpo padre de las que se generan. Una variante sustitucional de ejemplo es un anticuerpo maduro de afinidad, que se puede generar convenientemente utilizando
- 25 técnicas de maduración de afinidad con base en exhibición de fago. En resumen, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Los anticuerpos así generados visualizan las partículas de fago filamentosas como fusiones a por lo menos parte de una proteína cubierta de fago (por ejemplo, el producto de gen III de M 13) empaquetado dentro
- 30 de cada partícula. Las variantes de exhibición de fago luego se detectan por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Con el fin de identificar los sitios de región hipervariable candidatos para modificación, mutagenia de exploración (por ejemplo, exploración de alanina) se puede desarrollar para identificar residuos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión de antígeno. Alternativamente,
- 35 o adicionalmente, puede ser benéfico analizar una estructura de cristal del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en el arte, que incluyen aquellas elaboradas aquí. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a detección utilizando técnicas

conocidas en el arte, que incluyen aquellas descritas aquí, y variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se puede seleccionar para desarrollo adicional.

- 5 [00202] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencia de aminoácido del anticuerpo se preparan por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácido que ocurren naturalmente) o preparación por mutagenia mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagenia PCR, y mutagenia de casete de una variante preparada más temprano o una versión de no variante del anticuerpo.

- 15 [00203] Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácido en una región Fc de anticuerpos de la invención, que genera por lo tanto una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 Fc humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido que incluyen aquellas de una bisagra cisteína.

- 20 [00204] De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones como se compara con el anticuerpo contraparte tipo intacto, por ejemplo, en la región Fc. No obstante estos anticuerpos retendrían sustancialmente las mismas características requeridas para utilización terapéutica cuando se compara con su contraparte tipo intacto. Por ejemplo, se considera que se pueden hacer ciertas alteraciones en la región Fc que resultaría en unión Clq alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en WO99/51642. Ver también Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); Patente Estadounidense No. 5,648,260; Patente Estadounidense No. 5,624,821; y WO94/29351 relacionado con otros ejemplos de variantes de la región Fc. La WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida para los FcR. El contenido de estas publicaciones de patente se incorpora específicamente aquí como referencia. Ver, también, Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con vidas útiles incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable para la transferencia de los IgG maternos al feto (Guyer et al, J. Immunol. 1 17:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et al). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones que mejoran aquí la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes de polipéptido con las secuencias de

aminoácido de región Fc alterada y capacidad de unión Clq reducida o incrementada se describen en la Patente Estadounidense No. 6, 194,55 IBI, WO99/51642. Los contenidos de aquellas publicaciones de patente se incorporan específicamente aquí como referencia. Ver, también, Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178- 4184 (2000).

5

[00205] En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interface de los polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, en donde las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y en una cavidad en un segundo polipéptido Fc, en donde la protuberancia es

10 Fc y en una cavidad en un segundo polipéptido Fc, en donde la protuberancia es posicionable en la cavidad para promover la complejación del primer y el segundo polipéptidos Fc. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,731,168.

15

[00206] En todavía otro aspecto, puede ser deseable crear anticuerpos contruidos por ingeniería cisteína, por ejemplo, "tioMAb," en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos cisteína. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir aquellos residuos con cisteína, los

20 grupos tiol reactivos se posicionan por lo tanto en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo a otros grupos funcionales, tal como grupos funcionales de fármaco o grupos funcionales de fármaco ligados, como se describe adicionalmente aquí. En ciertas realizaciones, cualquiera uno o más de los siguientes residuos se puede sustituir con cisteína: región Fc V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; Al 18 (Numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (Numeración EU) de la

25 cadena pesada.

Derivados de anticuerpo

30

[00207] Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar adicionalmente por contener grupos funcionales no proteináceos adicionales que se conocen en la técnica y fácilmente disponibles. Preferiblemente, los grupos funcionales adecuados para la derivación del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG),

35 copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, povidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de anhídrido etileno/maleico, poliaminoácidos homopolímeros o copolímeros aleatorizados), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros propropilenglicol, copolímeros de óxido de etileno/óxido de prolipropileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol),

alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar, y si se adhiere más de un polímero, ellos pueden tener las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para derivación se puede determinar con base en las consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a ser mejorado, si el derivado de anticuerpo se utiliza en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

[00208] En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y grupos funcionales no proteínicos que se puede calentar selectivamente mediante la exposición a la radiación. En una realización, el grupo funcional no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, se asesinan las longitudes de onda que no perjudican células ordinarias, pero que calientan el grupo funcional no proteínico a una temperatura en la que las células próximas al grupo funcional no proteínico de anticuerpo.

Inmunokonjugados

[00209] La invención también proporciona inmunokonjugados (referido intercambiamente como "conjugados de fármaco-anticuerpo," o "ADC") que comprende un anticuerpo conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor de crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina de proteína, una toxina enzimáticamente activa de bacterias, hongos, plantas, o de origen animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[00210] Los inmunokonjugados se han utilizado para el suministro local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que asesinan o inhiben el crecimiento o proliferación de células, en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) Curr. Opin. in Pharmacology 5:543-549; Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1 137-1146; Payne, G. (2003) y 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu- Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26:151-172; U.S. Pat. No. 4,975,278). Los inmunokonjugados permiten el suministro objetivado de un grupo funcional de fármaco para un tumor, y acumulación intracelular aquí, en donde la administración sistémica de fármacos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad a células normales así como también las células de tumor que se busca eliminar (Baldwin et al,

Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 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, eds) pp. 475-506. Ambos anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales se han reportados como útiles en estas estrategias (Rowland et al, (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al, (1986) supra). Las toxinas utilizadas en los conjugados de toxina-anticuerpo incluyen toxinas bacterianas tal como toxina difteria, toxinas de planta tal como ricina, toxinas de molécula pequeña tal como geldanamicina (Mandler et al (2000) J 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), maitansinoides (EP 1391213; Liu et al, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos mediante mecanismos que incluyen unión a unión de tubulina, de ADN, o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienen a ser inactivos o menos activos cuando se conjuga a anticuerpos grandes o ligandos del receptor de proteína.

[00211] El ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 de murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B malignos y normales y ¹¹¹In radioisótopo o ⁹⁰Y unido en un ligador-quelador de tiourea (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). Aunque el ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin de célula B (NHL), la administración resulta en citopenas prolongadas y severas en la mayoría de pacientes. MYLOT ARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de fármaco-anticuerpo compuesto de un anticuerpo huCD33 ligado a caliqueamicina, se mejora en el 2000 para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; Patente Estadounidense Nos. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 57391 16; 5767285; 5773001). El Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo huC242 ligado por vía de un enlace de disulfuro SPP al grupo funcional de fármaco maitansinoide, el DMI, se aventaja en ensayos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tal como cáncer de colon, pancreático, gástrico, y otros cánceres. El MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del antígeno de membrana específico anti-próstata (PSMA) anticuerpo monoclonal ligado al grupo funcional de fármaco maitansinoide, el DMI, está bajo desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los

péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugan a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico para Lewis Y en carcinomas) y cACIO (específico para CD30 en malignidades hematológicas) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnol. 21(7):778-784) y están bajo desarrollo terapéutico.

[00212] En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen aquí (por ejemplo, anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden utilizar incluyen cadena difteria A, fragmentos activos sin unión de toxina difteria, cadena exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena ricina A, cadena abrina A, cadena modeccina 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. Ver, por ejemplo, WO 93/21232 publicada en Octubre 28, 1993. Una variedad de radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Se hacen conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico utilizando una variedad de agentes de acoplamiento a proteína bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos bis- flúor activos (tal como 1,5-difluoro-2,4- dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina ricina se puede preparar como se describe en Vitetta et al, Science, 238: 1098 (1987). El ácido de carbono 14-marcado 1 - isotiocianatobencil- 3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótido para el anticuerpo. Ver WO94/11026.

[00213] Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tal como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno, y CC 1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan aquí.

Maitansina y maitansinoides

[00214] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) conjugado a una o más moléculas maitansinoides.

[00215] Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan al inhibir la polimerización de tubulina. La maitansina primero se aísla del arbusto *Maytenus serrata* del oriente de África (Patente Estadounidense No. 3,896,111). Posteriormente, se descubre que ciertos microbios también producen maitansinoides, tal como maitansinol y ésteres maitansinol C-3 (Patente Estadounidense No. 4,151,042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se describen, por ejemplo, en Patente Estadounidense 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.

[00216] Los grupos funcionales de fármaco Maitansinoide son grupos funcionales de fármaco atractivos en conjugados de fármaco de anticuerpo debido a que ellos son: (i) relativamente accesibles para preparar mediante fermentación o modificación química, derivación de productos de fermentación, (ii) agradable para derivación con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de ligadores sin disulfuro para los anticuerpos, (iii) estable en plasma, y (iv) efectivo contra una variedad de estirpes celulares de tumor.

[00217] Se describen inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para elaborar los mismos, y su uso terapéutico, por ejemplo, en la Patente Estadounidense Nos. 5,208,020, 5,416,064 y Patente Europea EP 0 425 235 B1, cuyas descripciones se incorporan expresamente aquí como referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describe inmunoconjugados que comprenden un ligado DMI designado maitansinoides para el anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorectal humano. El conjugado se encuentra que es altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas, y muestran actividad antitumor en un ensayo de crecimiento de tumor in vivo. Chari et al, Cancer Research 52:127-131 (1992) describe inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjuga por vía de un ligador disulfuro para el anticuerpo de murino A7 unido a un antígeno en estirpes celulares de cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal de murino TA.1 que une el oncogen HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1 -maitansinoide se prueba in vitro en la estirpe celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa antígenos de superficie 3 x 10⁵ HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanza un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que se podría incrementar al incrementar el número de moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide muestran baja citotoxicidad sistémica en ratones.

[00218] Se preparan conjugados maitansinoides de anticuerpo al ligar químicamente un anticuerpo a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,208,020 (cuya descripción se incorpora expresamente aquí como referencia). Un promedio de 3-4 moléculas maitansinoides conjugados por la molécula de anticuerpo tiene eficacia mostrada en mejorar la citotoxicidad de células objetivo sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, aunque aún una molécula de toxina/anticuerpo se esperaría que mejorara la citotoxicidad sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o se aíslan de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5,208,020 y en otras patentes y publicaciones de no patente referidas aquí anteriormente. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula maitansinol, tal como varios ésteres maitansinol.

[00219] Existen muchos grupos ligados conocidos en la técnica para elaborar con jugados de anticuerpo-maitansinoide, que incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en la Patente Estadounidense No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al, Cancer Research 52: 127-131 (1992), y Solicitud de Patente Estadounidense No. 10/960,602, presentada Oct. 8, 2004, cuyas descripciones se incorporan expresamente aquí como referencia. Los conjugados de anticuerpo- maitansinoide que comprende el componente ligador SMCC se pueden preparar como se describe en la Solicitud de Patente Estadounidense No. 10/960,602, presentado en Oct. 8, 2004. Los grupos de ligado incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles de ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa, o grupos lábiles esterasa, como se describe en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos de disulfuro y tioéter. Se describen grupos de ligado adicionales y se ejemplifican aquí.

[00220] Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden hacer utilizando utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano- 1 -carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tal como suberato disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p- azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6- diisocianato), y compuestos bis-flúor activo (tal como 1 ,5-difluoro-2,4- dinitrobenceno). Los agentes de

acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2- piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2- piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un ligado de disulfuro.

- 5 [00221] El ligador se puede adherir a la molécula maitansinoide en varias posiciones, dependiente del tipo del enlace. Por ejemplo, un ligado éster se puede formar mediante reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C- 14 modificada con hidroximetilo, la posición C- 15 modificada con un grupo hidroxilo, y la
- 10 posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el ligado se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo maitansinol.

Auristatinas y dolastatinas

- 15 [00222] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a las dolastatinas o análogos o derivados peptídicos dolostatina, las auristatinas (Patente Estadounidense Nos. 5,635,483; 5,780,588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con dinámicos de microtúbulo, hidrólisis GTP, y división celular y nuclear (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents y Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásico (Patente Estadounidense No. 5,663,149) y actividad antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El grupo funcional de fármaco dolastatina o auristatina se puede adherir al anticuerpo a través del terminal N (amino) o el terminal C (carboxilo) del grupo funcional de fármaco peptídico (WO 02/088172).

- 25 [00223] Realizaciones de auristateno de ejemplo incluyen los grupos funcionales monometilauristatina ligados al Terminal N DE y DF, se describe en "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," U.S. Ser. No. 10/983,340, presentada en Nov. 5, 2004, cuya descripción se incorpora expresamente aquí como referencia en su
- 30 totalidad.

- [00224] Típicamente, se pueden preparar grupos funcionales de fármaco con base en péptido al formar un enlace de péptido entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Se pueden preparar tales enlaces de péptido, por ejemplo, de acuerdo con el
- 35 método de síntesis de fase líquida (ver E. Schroder y K. Lubke, "The Peptides," volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptido. Los grupos funcionales de fármaco auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos de: US 5,635,483; US 5,780,588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277;

Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Ver también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," US Ser. No. 10/983,340, presentado en Nov. 5, 2004, incorporado expresamente aquí como referencia en su totalidad (que describe, por ejemplo, ligadores y métodos para preparar compuestos monometilvalina tal como MMAE y MMAF conjugado a los ligadores).

Caliqueamicina

[00225] En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de Caliqueamicina. La familia Caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir rupturas de ADN bicatenarios en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de los conjugados de la familia Caliqueamicina, ver Patente Estadounidense Nos. 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (para toda la Compañía Cianamida Americana). Los análogos estructurales de Caliqueamicina que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, γ ll, α 2l, α 3l, N-acetil- γ ll, PSAG y θ 11 (Hinman et al, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las Patentes Estadounidenses mencionadas anteriormente para la Cianamida Americana). Otro fármaco anti-tumor que el anticuerpo puede conjugar es QFA que es un antifolato. La Caliqueamicina y QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruza fácilmente la membrana de plasma. Por lo tanto, la retoma celular de estos agentes a través del anticuerpo media la internalización que mejora mayormente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[00226] Otros agentes antitumor que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptoizocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocen colectivamente el complejo LL-E33288 descrito en la Patente Estadounidense Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como también esperamicinas (Patente Estadounidense No. 5,877,296).

[00227] Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden utilizar incluyen cadena difteria A, fragmentos activos sin unión de toxina difteria, cadena exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), cadena ricina A, cadena abrina A, cadena modeccina 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. Ver, por ejemplo, WO 93/21232 publicado en Octubre 28, 1993.

[00228] La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una deoxiribonucleasa; DNasa).

[00229] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Está disponible una variedad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para detección, este puede comprender un átomo radioactivo para estudios cintigráficos, por ejemplo ^{99m}Tc o ^{112}In , o una marca de giro para formación de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como formación de resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-1,1,1, flúor-19, carbon-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[00230] Las radio- u otras marcas se pueden incorporar en el conjugado en formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis de aminoácido químico utilizando precursores de aminoácidos adecuados que involucran, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Las marcas tal como ^{99}Tc o ^{123}I , Re^{186} , Re^{188} y In^{111} se pueden adherir por vía de un residuo cisteína en el péptido. Se puede adherir itrio-90 por vía de un residuo lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

[00231] Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se pueden hacer utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinirnidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tal como suberato disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoi)-etilenediamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos bis-flúor activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede prepara una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al, Science 238:1098 (1987). El ácido Carbon-14-marca 1-isotiocianatobenci-3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación del radionucleótido para el

anticuerpo. Ver WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador dividible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un ligador lábil de ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari et al, Cancer Research 52:127- 131 (1992); Patente Estadounidense No. 5,208,020).

[00232] Los compuestos contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos reticulados: 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 comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Ver páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook y Catálogo.

Preparación de conjugados de fármaco de anticuerpo

[00233] En los conjugados de fármaco de anticuerpo (ADC), un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más grupos funcionales de fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 grupos funcionales de fármaco por anticuerpo, a través de un ligador (L). El ADC de Fórmula I se puede preparar mediante varias rutas, empleando reacciones de química orgánica, condiciones, y reactivos conocidos por aquellos expertos en la técnica, que incluye: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo ligador bivalente, para formar Ab-L, por vía de un enlace covalente, seguido por reacción con un grupo funcional del fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un grupo funcional de fármaco con un reactivo ligador bivalente, para formar D-L, por vía de un enlace covalente, seguido por reacción con el grupo nucleófilo seguido por reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Los métodos adicionales para preparar ADC se describen aquí.



[00234] El ligador se puede componer de uno o más componentes ligadores. Los componentes ligadores de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala- phe"), p-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidilo (4-iodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"): los componentes de ligador adicionales se conocen en la técnica y algunos se describen aquí. Ver también "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," US Ser. No. 10/983,340, presentado en

Nov. 5, 2004, cuyos contenidos se incorporan expresamente aquí como referencia en su totalidad.

[00235] En algunas realizaciones, el ligador puede comprender residuos de aminoácido.

5 Los componentes ligadores de aminoácido de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Dipéptidos de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Tripéptidos de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly)- Los residuos de aminoácido que comprenden un componente ligador de aminoácido incluyen aquellos de
10 ocurrencia natural, así como también aminoácidos menores y análogos de aminoácido de ocurrencia no natural, tal como citrulina. Los componentes de ligador de aminoácido se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para división enzimática mediante una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

15

[00236] Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina de Terminal N, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo 1 o amino de azúcar en donde se glucosila el anticuerpo. Los grupos amina, tiol, y hidroxilo son
20 nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en grupos funcionales ligadores y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tal como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) haluros alquilo y bencilo tal como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo, y grupos maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercadena reducible, es decir puentes
25 cisteína. Se pueden hacer anticuerpos reactivos para conjugación con reactivos ligadores mediante tratamiento con un agente de reducción tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleófilos adicionales se pueden introducir en anticuerpos a través de la reacción e lisinas con 2-iminotiolano (reactivos de Traut) que resulta en la conversión con una amina en un tiol. Se
30 pueden introducir grupos tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) al introducir uno, dos, tres, cuatro, o más residuos cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos cisteína no nativos de aminoácido).

35

[00237] Los conjugados de fármaco de anticuerpo también se pueden producir mediante la modificación del anticuerpo para introducir grupos funcionales electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo o fármaco ligador. Los azúcares de anticuerpos glucosilados se pueden oxidar, por ejemplo con reactivos de oxidación de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo

amina de reactivos ligadores o grupos funcionales de fármaco. Los grupos base Schiff imina resultantes forman un ligado estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos borohidruro para formar ligados de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que puede reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen residuos treonina o serina de terminal N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, resultando en la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5,362,852). Tales aldehídos pueden reaccionar con un grupo funcional de fármaco o nucleófilo ligador.

[00238] De forma similar, los grupos nucleófilos en un grupo funcional de fármaco incluyen, pero no se limitan a: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en grupos funcionales ligadores y reactivos ligadores que incluyen: (i) ésteres activos tal como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) haluros alquilo y bencilo tal como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo, y grupos maleimida.

[00239] Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico se puede hacer, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptido. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado adyacente uno al otro o separado por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[00240] En todavía otra realización, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para el uso en tumor pre-objetivo en donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, luego de la remoción del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de depuración y luego de la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga en un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Ciertos Métodos para Elaborar Anticuerpos

Ciertos Métodos con base en hibridoma

[00241] Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden hacer utilizando el método de hibridoma descrito primero por Kohler et al, Nature, 256:495 (1975), y se

describe adicionalmente, por ejemplo, en Hongo et al, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al, Anticuerpos: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al. , in: Monoclonal Anticuerpos and T-Cell Hybridomas 563- 681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) con respecto a hibridomas humano-humano. Los métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 7,189,826 con respecto a la producción de anticuerpos IgM naturales humanos monoclonales de estirpes celulares de hibridoma. La tecnología de hibridoma humana (tecnología Trioma) se describe en Vollmers y Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3): 185-91 (2005).

[00242] Para varias otras técnicas de hibridoma, ver, por ejemplo, US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos completamente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y Patente Estadounidense Nos. 7,078,492 y 7,153,507. Un protocolo de ejemplo para producir anticuerpos monoclonales utilizando el método de hibridoma se describe como sigue. En una realización, un ratón u otro animal anfitrión apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que unirán específicamente a la proteína utilizada para inmunización. Se elevan anticuerpos en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido que comprende VEGF o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como lípido monofosforilo A (MPL)/trehalosa dicrinomicolato (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Un polipéptido que comprende VEGF o un fragmento del mismo se pueden preparar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tal como métodos recombinantes, algunos de los cuales se describen adicionalmente aquí. El suero de animales inmunizados se evalúa para anticuerpos anti-VEGF, y las inmunizaciones inoculadas se administran opcionalmente. Se aíslan linfocitos de animales que producen anticuerpos anti-VEGF. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro.

[00243] Los linfocitos luego se fusionan con células mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Ver, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles y Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986). Se pueden utilizar células de mieloma que fusionan eficientemente, soportan establemente la producción de alto nivel del anticuerpo mediante las células que producen anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las células mieloma de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma de murino, tal como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-1 1 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y

células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Las estirpes celulares heteromieloma de ratón-humano y mieloma de humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[00244] Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se hacen crecer en medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células mieloma parentales carecen de la enzima transferasa fosforibosilo guanina hipoxantina (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirán hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT. Preferiblemente, se utilizan métodos de cultivo de célula hibridoma libre de suero para reducir el uso de suero derivado de animal tal como suero bovino fetal, como se describe, por ejemplo, en Even et al., Trends in Biotechnology, 24(3), 105- 108 (2006).

[00245] Los oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos celulares de hibridoma se describen en Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 11 1- 122 (2005). Específicamente, los medios de cultivo estándar se enriquecen con ciertos aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina), o con fracciones de hidrolizado de proteína, y se puede suprimir significativamente la apoptosis mediante oligopéptidos sintéticos, constituidos de tres a seis residuos de aminoácido. Los péptidos están presentes en concentraciones milimolares o mayores.

[00246] El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se hacen crecer se puede evaluar para la producción de anticuerpos monoclonales que unen a VEGF. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producido por células de hibridoma se puede determinar mediante inmunosupresión o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard. Ver, por ejemplo, Munson et al, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

[00247] Después que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de limitación subclonados y se hacen crecer mediante métodos estándar. Ver, por ejemplo, Goding, supra. El medio de cultivo adecuado para este propósito

incluye, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI- 1640. Adicionalmente, las células de hibridoma se pueden hacer crecer in vivo como tumores ascitas en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascitas, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tal como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía hidroxilapatita, electrofóresis de gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para el aislamiento de las proteínas de células de hibridoma se describe en US 2005/176122 y Patente Estadounidense No. 6,919,436. El método incluye utilizar sales mínimas, tal como sales liotrópicas, en los procesos de unión y preferiblemente utilizando también cantidades pequeñas de disolventes orgánicos en el proceso de elución.

Ciertos Métodos de Detección de Colección

[00248] Los anticuerpos de la invención se pueden hacer al utilizar colecciones combinatorias para la detección de anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la técnica una variedad de métodos para generar colecciones de exhibición de fago y detectar tales colecciones para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Tales métodos se describen generalmente en Hoogenboom et al in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Por ejemplo, un método para generar anticuerpos es interés es a través del uso de una colección de anticuerpo de fago como se describe en Lee et al, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93.

[00249] En principio, se seleccionan clones de anticuerpo sintéticos mediante la detección de colección de fago que exhiben varios fragmentos de la región variable de anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína cubierta de fago. Tales colecciones de fago se filtran mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los fragmentos Fv que expresan clones capaces de unir al antígeno deseado se adsorben con el antígeno y así se separan de los clones sin unión en la colección. Los clones de unión luego se eluyen del antígeno, y se pueden enriquecer adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se pueden obtener al diseñar un procedimiento de detección de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido por la construcción del clon de anticuerpo de longitud completa utilizando las secuencias Fv del clon de fago de interés y las secuencias de región constante adecuadas (Fc) descritas en Kabat et al. , Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91 -3242, Bethesda MD (1991), vols. 1 -3.

[00250] En ciertas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada uno de las cadenas liviana (VL) y pesada (VH), que presentan tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden exhibir funcionalmente en fago, como fragmentos Fv de cadena única (scFv), en los que VH y VL se ligan covalentemente a través de un péptido flexible, corto, o como fragmentos Fab, en los que ellos cada uno se fusionan en un dominio constante y no interactúan covalentemente, como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol, 12: 433-455 (1994). Como se utiliza aquí, el scFv que codifica los clones de fago y Fab que codifica los clones de fago se refieren colectivamente a "clones de fago Fv" o "clones Fv."

[00251] Los repertorios de genes VH y VL se pueden clonar separadamente mediante reacción de cadena polimerasa (PCR) y se recombina aleatoriamente en colecciones de fago, que luego se pueden buscar para clones de unión a antígeno como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol, 12: 433-455 (1994). Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin el requerimiento de construcción de hibridomas. Alternativamente, el repertorio neófito se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos en un amplio rango de autoantígenos y también no autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al, EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las colecciones neófito también se pueden hacer sintéticamente al clonar segmentos de gen V no dispuestos de células madre, y utilizando cebadores PCR que contienen secuencia aleatorizada para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para llevar a cabo la redistribución in vitro como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol, 227: 381-388 (1992).

[00252] En ciertas realizaciones, se utiliza fago filamentoso para exhibir los fragmentos de anticuerpo mediante fusión en el glóbulo de proteína cubierto menor. Se pueden exhibir fragmentos de anticuerpo como fragmentos Fv de cadena única, en los que se conectan los dominios VH y VL en la misma cadena de polipéptido mediante un espaciador de polipéptido flexible, por ejemplo, como se describe por Marks et al., J. Mol. Biol, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que se fusiona una cadena a píldora y el otro se secreta en el periplasma de célula anfitriona bacteriana en donde el ensamble de una estructura de proteína cubierta Fab que llega a exhibir en la superficie de fago al desplazar algunas de las proteínas cubiertas tipo intacto, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom et al, Nucl Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

[00253] En general, los ácidos nucleicos que codifican los fragmentos de gen de anticuerpo se obtienen de células inmunes cosechadas de humanos o animales. Si se

desea que una colección basada a favor de clones anti-VEGF, el sujeto se inmuniza con VEGF para generar una respuesta de anticuerpo, y las células de bazo y/o células B circulantes diferentes a los linfocitos de sangre periférica (PBL) se recuperan para la construcción de librería. En una realización preferida, una colección de fragmento de gen de anticuerpo humano basada a favor de clones anti-VEGF se obtiene al generar una respuesta de anticuerpo anti-VEGF en ratones transgénicos que llevan una disposición de gen de inmunoglobulina humana funcional (y carecen de un sistema de producción de anticuerpo endógeno funcional) de tal manera que la inmunización VEGF eleva a las células B produciendo anticuerpos humanos contra VEGF. La generación de ratones transgénicos que producen el anticuerpo humano se describe adelante.

[00254] El enriquecimiento adicional para poblaciones de célula reactiva anti-VEGF se puede obtener al utilizar un procedimiento de detección adecuado para aislar células B que expresan anticuerpo unido a membrana específica VEGF, por ejemplo, mediante separación celular utilizando cromatografía de afinidad VEGF o adsorción de células para el VEGF marcado fluorocromo seguido por clasificación de células activadas (FACS).

[00255] Alternativamente, el uso de células de bazo y/o células B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del repertorio de anticuerpo posible, y también permite la construcción de una colección de anticuerpo utilizando cualquier especie animal (humano o no humano) en los que el VEGF no es antigénico. Para colecciones que incorporan la construcción de gen de anticuerpo in vitro, se cosechan células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican los segmentos de gen de anticuerpo no dispuestos. Las células inmunes de interés se pueden obtener de una variedad de especies animales, tal como humano, ratón, rata, lagomorfa, luprino, canino, felino, porcino, bovino, equino, y especies aviares, etc.

[00256] El ácido nucleico que codifica los segmentos de gen variable de anticuerpo (incluyendo segmentos VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de las colecciones de gen VH y VL predispuestas, el ADN deseado se puede obtener al aislar el ADN genómico o mRNA de los linfocitos luego de la reacción de la cadena polimerasa (PCR) con cebadores de emparejamiento los extremos 5' y 3' de genes VH y VL redispuestos como se describe en Orlandi et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A), 86: 3833-3837 (1989), elaborar por lo tanto repertorios de gen V diversos para expresión. Los genes V se pueden amplificar de cADN y ADN genómico, con cebadores de respaldo en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores delanteros basados dentro del segmento J como se describe en Orlandi et al (1989) y en Ward et al, Nature, 341 : 544-546 (1989). Sin embargo, para la amplificación del cADN, los cebadores de respaldo también se pueden basar en el exón líder como se describe en

Jones et al, *Biotechnol*, 9: 88-89 (1991), y cebadores delanteros dentro de la región constante como se describe en Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi et al. (1989) o Sastry et al. (1989). En ciertas realizaciones, se maximiza la diversidad de la colección al utilizar cebadores PCR objetivados en cada familia del gen V con el fin de amplificar todas las disposiciones VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de célula inmune, por ejemplo como se describe en el método de Marks et al., *J. Mol. Biol*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum et al, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN ejemplificado en los vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción raros dentro del cebador PCR como una etiqueta en un extremo como se describe en Orlandi et al (1989), o mediante amplificación PCR adicional con un cebador etiquetado como se describe en Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

[00257] Los repertorios de genes V sintéticamente redispuestos se pueden derivar in vitro de segmentos de gen V. La mayor parte de los segmentos de gen VH humano se han clonado y secuenciado (reportado en Tomlinson et al, *J. Mol Biol*, 227: 776-798 (1992)), y se mapean (reportado en Matsuda et al, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (que incluyen toda la mayoría de conformaciones de bucle H1 y H2) se puede utilizar para generar diversos repertorios de gen VH con cebadores PCR que codifican H3 bucles de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol*, 227: 381-388 (1992). Los repertorios VH también se pueden hacer con toda la diversidad de secuencia en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos VK y VL clonados se han clonado y secuenciado (reportado en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol*, 23: 1456- 1461 (1993)) y se puede utilizar para elaborar repertorios de cadena liviana sintética. Los repertorios de gen V sintético, con base en un rango de VH y VL veces, y longitudes L3 y H3, codificará los anticuerpos de diversidad estructural considerable. Luego de la amplificación del gen V que codifica ADN, se pueden disponer segmentos de gen V de línea germinal in vitro de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, *J Mol. Biol*, 227: 381-388 (1992).

[00258] Los repertorios de los fragmentos de anticuerpo se pueden construir al combinar repertorios de gen VH y VL juntos en varias formas. Cada repertorio se puede crear en diferentes vectores, y los vectores se recombinan in vitro, por ejemplo, como se describe en Hogrefe et al, *Gene*, 128: 1 19-126 (1993), o in vivo mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse et al, *Nucl Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El alcance de recombinación in vivo explotan la naturaleza de dos cadenas de fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la colección impuesto por eficiencia

en la transformación de *E. coli*. Los repertorios neófitos VH y VL se clonan separadamente, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Las dos colecciones luego se combinan mediante infección de fago en bacterias que contienen fagémido de tal manera que la célula contiene diferente combinación y el tamaño de la colección se limita solo por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación in vivo de tal manera que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se coempaca en viriones de fago. Estas colecciones proporcionan grandes cantidades de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

[00259] Alternativamente, se pueden clonar secuencialmente repertorios en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 88: 7978- 7982 (1991), o se ensambla juntos por PCR y luego clonar, por ejemplo como se describe en Clackson et al, Nature, 352: 624-628 (1991). También se puede utilizar ensamble PCR para unir los ADN VH y VL con ADN que codifica un espaciador de péptido flexible para formar repertorios Fv de cadena única (scFv). En todavía otra técnica, "el ensamble PCR en células" se utiliza para combinar genes VH y VL con linfocitos por PCR y luego clonar los repertorios de genes ligados como se describe en Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

[00260] Los anticuerpos producidos por colecciones neófito (natural o sintético) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de afinidad también se puede imitar in vitro al construir y deseleccionar de colecciones secundarias como se describe en Winter et al. (1994), supra. Por ejemplo, se puede introducir la mutación aleatorizada in vitro al utilizar polimerasa propensa a error (reportado en Leung et al, Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método of Hawkins et al, J. Mol Biol, 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram et al , Proc. Natl Acad. Sci U.S.A, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, se puede desarrollar maduración de afinidad al mutar aleatoriamente uno o más CDR, por ejemplo, utilizando PCR con cebadores que llevan la secuencia aleatoria que abarca el CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y detección para clones de alta afinidad. La WO 9607754 (publicada el 14 Marzo 1996) describe un método para inducir mutagenia en una región determinante de complementariedad de una cadena liviana de inmunoglobulina para crear una colección de genes de cadena liviana. Otro alcance efectivo es recombinar los dominios VH o VL seleccionados mediante exhibición de fago con repertorios de variantes de dominio V de ocurrencia natural obtenidos de donantes no inmunizados y detección de alta afinidad en varias rondas de mezcla de cadena como se describe en Marks et al, Biotechnol, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

[00261] La detección de las colecciones se puede llevar a cabo mediante varias técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, se puede utilizar VEGF para cubrir los pozos de placas de adsorción, expresado en células anfitrionas fijas a las placas de adsorción o utilizado en clasificación celular, o conjugado con biotina para capturar con glóbulos cubiertos con estreptavidina, o se utiliza en cualquier otro método para colecciones de exhibición de fago de tamizado.

[00262] Se pone en contacto muestras de colecciones de fago con VEGF inmovilizado bajo condiciones adecuadas para unir por lo menos una porción de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo pH, resistencia iónica, temperatura y similares se selecciona para imitar condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a las fase sólida se lavan y luego se eluyen mediante ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas et al, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo, como se describe en Marks et al, J. Mol Biol, 222: 581-597 (1991), o mediante competición de antígeno VEGF, por ejemplo, en un procedimiento similar al método de competición de antígeno de Clackson et al, Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1, 000-veces en una ronda única de selección. Más aún, los fagos enriquecidos se pueden hacer crecer en cultivo bacteriano y se someten a rondas adicionales de selección.

[00263] La eficiencia de selección depende de muchos factores, que incluyen las cinéticas de disociación durante el lavado, y si los múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago se pueden acoplar simultáneamente con antígeno. Los anticuerpos con cinéticas de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) can se pueden retener mediante el uso de lavados cortos, exhibición de fago multivalente y densidad de alto recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, pero favorece la reunión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinéticas de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de lavados largos y exhibición de fago monovalente como se describe en Bass et al, Proteins, 8: 309- 314 (1990) y en WO 92/09690, y una densidad de cubrimiento bajo de antígeno como se describe en Marks et al, Biotechnol, 10: 779-783 (1992).

[00264] Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, aún con afinidades que difieren ligeramente, para VEGF. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionar (por ejemplo, cómo se desarrolla en algunas técnicas de maduración de afinidad) fácilmente hace surgir muchos mutantes, la mayoría unen al antígeno, y unos pocos con alta afinidad. Con VEGF limitante, el fago de alta afinidad se

puede complementar. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, se pueden incubar fagos con VEGF biotinilado en exceso, pero con el VEGF biotinilado en una concentración de baja molaridad que la constante de afinidad molar objetivo para VEGF. Luego se pueden capturar fagos de unión de alta afinidad mediante glóbulos paramagnéticos cubiertos con estreptavidina. Tal "captura de equilibrio" permite a los anticuerpos ser seleccionados de acuerdo con sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con tan poco como dos veces mayor afinidad de un gran exceso de fagos con baja afinidad. Las condiciones utilizadas en fagos de lavado vinculado a una fase sólida también se pueden manipular para discriminar en la base de las cinéticas de disociación.

[00265] Se pueden seleccionar clones anti-VEGF con base en la actividad. En ciertas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-VEGF que unen a células vivas que expresan naturalmente VEGF. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-VEGF que bloquean la unión entre un ligando VEGF y VEGF, pero no bloquea la unión entre un ligando VEGF y una segunda proteína. Los clones Fv que corresponden a tales anticuerpos anti-VEGF se pueden seleccionar mediante (1) aislamiento de clones anti-VEGF de una colección de fago como se describió anteriormente, y amplificar opcionalmente la población aislada de clones de fago al hacer crecer la población en un anfitrión bacteriano adecuado; (2) seleccionar VEGF y si se desea una segunda proteína contra la cual bloquea y no bloquea la actividad, respectivamente; (3) adsorber los clones de fago anti-VEGF para inmovilizar VEGF; (4) utilizando un exceso de la segunda proteína para eluir cualesquier clones indeseados que reconocen los determinantes de unión VEGF que se sobrepone o comparte con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluir los clones que permanecen adsorbidos en la siguiente etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/no bloqueantes deseadas se pueden enriquecer adicionalmente al repetir los procedimientos de selección descritos aquí una o más veces.

[00266] Los anticuerpos monoclonales derivados de de hibridoma que codifica el ADN o clones Fv de exhibición de fago de la invención se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, al utilizar cebadores de oligonucleótido diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de cadena liviana y pesada de interés de la plantilla de ADN de fago o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede colar en los vectores de expresión, que luego se transfectan en células anfitrionas tal como células E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células mieloma que no producen de otra forma la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células anfitrionas recombinantes. Los artículos de revisión en expresión recombinante

en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluye Skerra et al. , Curr. Opinion in Immunol, 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

[00267] El ADN que codifica los clones Fv de la invención se puede combinar con las
 5 secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constantes de cadena liviana
 y/o pesada (por ejemplo las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener de Kabat
 et al., supra) para formar clones que codifican las cadenas pesada y/o liviana de longitud
 parcial o completa. Se apreciará que las regiones constantes de cualquier isotipo se
 10 pueden utilizar para este propósito, incluyendo las regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD,
 y IgE, y de tal manera que las regiones constantes se pueden obtener de cualesquier
 especies humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN de dominio variable de una
 especie animal (tal como humano) y luego se fusiona al ADN de región constante de otra
 especie animal para formar secuencias codificantes para "híbrido," se incluye la cadena
 liviana y/o cadena pesada de longitud completa en la definición de anticuerpo "quimérico"
 15 y "híbrido" como se utiliza aquí. En ciertas realizaciones, un clon Fv derivado de ADN
 variable humano se fusiona con el ADN de región constante humana para formar
 secuencias codificantes para las cadenas liviana y/o pesada humana de longitud parcial o
 completa.

[00268] El anticuerpo anti-VEGF que codifica el ADN derivado de un hibridoma de la
 20 invención también se puede modificar, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante
 para los dominios constantes de cadena liviana y pesada humana en lugar de secuencias
 de murino homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método
 de Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 81: 6851 -6855 (1984)). El anticuerpo o
 25 fragmento Fv o hibridoma que codifica el ADN se puede modificar adicionalmente al unir
 covalentemente a la secuencia que codifica la inmunoglobulina todo o parte de la
 secuencia codificante para un polipéptido sin inmunoglobulina. De esta forma, se
 preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del
 clon Fv o los anticuerpos derivados de clone de hibridoma de la invención.

Vectores, Células Anfitrionas, y Métodos Recombinantes

[00269] También se pueden producir anticuerpos utilizando métodos recombinantes. Para
 la producción recombinante de un anticuerpo anti-VEGF, el ácido nucleico que codifica el
 35 anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional
 (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede
 aislar fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, al
 utilizar sondas de oligonucleótido que son capaces de unir específicamente a los genes
 que codifican las cadenas liviana y pesada del anticuerpo). Están disponibles muchos

vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento mejorador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción.

5

Componente de la secuencia de señal

[00270] Un anticuerpo de la invención se puede producir recombinantemente no solo directamente, sino también una función de polipéptido con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia de señal u otro polipéptido que tienen un sitio de división específico en el Terminal N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que se reconoce y se procesa (es decir, se divide por una peptidasa de señal) mediante una célula anfitriona. Para células anfitrionas procarióticas que no reconocen y procesan una secuencia de señal de anticuerpo nativa, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariótica, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o líderes enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levadura la secuencia de señal nativa se puede sustituir mediante, por ejemplo, el líder invertasa de levadura, el líder de factor α (que incluye líderes del factor α *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder de fosfatasa ácida, los C. líder glucoamilasa *albicans*, o la señal descrita en la WO 90/13646. En la expresión celular de mamífero, las secuencias de señal de mamífero así como también están disponibles los líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal herpes simplex gD.

Origen de replicación

[00271] Los vectores de clonación y expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite replicar al vector en una o más células anfitrionas seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación esta secuencia es una que permite al vector replicar independientemente del ADN cromosómico anfitrión, e incluye orígenes de replicación o secuencias que replican autónomamente. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levadura, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen de plásmido 2 μ es adecuado para levadura, y varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonación de vectores en células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no se necesita para vectores de expresión de mamífero (el origen SV40 se puede utilizar típicamente solo debido a que este contiene el promotor temprano).

[00277] Alternativamente, las células anfitrionas (anfitriones tipo natural que contienen vHFR endógeno) transformado o co-transformado con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, gen DHFR tipo natural, y otro marcador seleccionable tal como 3'-fosfotransferasa aminoglicosida (APH) que se puede seleccionar mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina, o G418. Véase Patente Estadounidense No.4,965,199.

[00278] Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 (Stinchcomb et al, Nature, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que le falta la capacidad de crecer en triptofan, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de célula anfitrión de levadura proporciona luego un ambiente efectivo para detectar la transformación mediante el crecimiento en la ausencia de triptofan. De manera similar, las cepas de levadura deficiente de *Leu2-* (ATCC 20,622 o 38,626) se complementan mediante plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*.

[00279] Adicionalmente, se pueden utilizar vectores derivados de plásmido circular pKD1 de 1.6 μ m para transformación de levadura *Kluyveromyces*. Alternativamente, se reporta un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de becerro recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). También se han descrito vectores de expresión multi-copia estables para secreción de albumina de suero humanos o recombinante madura mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991).

Componente promotor

[00280] Vectores de clonación y clonación que contienen generalmente un promotor que se reconoce por el organismo anfitrión y se liga operablemente al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para uso con anfitriones procariotico incluyen el promotor *phoa*, sistema de promotor lactosa y β -lactamasa, promotor fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptofan (*trp*), y promotores híbridos tal como promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos También contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S. D.) ligada operablemente al ADN que codifica un anticuerpo.

[00281] Se conocen secuencias promotoras para eucariotes. Virtualmente todos genes eucarióticos tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases en la

dirección cinco prima desde el sitio en donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encuentra 70 a 80 bases en la dirección cinco prima desde el inicio de la transcripción de muchos genes hay una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucarióticos hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poliA al extremo 3' de la secuencia de la codificación. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en los vectores de expresión eucariótico.

[00282] Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con anfitriones de levadura incluyen promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, tal como enolasa, gliceraldehido-3 -fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3- fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucocinasa.

[00283] Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con metabolismo de nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehido-3 -fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables para la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores adecuados y promotores para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en la EP 73,657. También se utilizan ventajosamente intensificadoras de levadura con los promotores de levadura.

[00284] la transcripción de anticuerpo de vectores en células anfitrionas de mamíferos se pueden controlar, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tal como el virus polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B, Virus Simian 40 (SV40), o de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, dado que tales promotores son compatible con sistemas celulares anfitrionas.

[00285] los promotores tempranos y tardíos del SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricciones SV40 que también contienen SV40 viral de origen de replicación. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humanos o se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en anfitriones mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como un vector se describe en la Patente Estadounidense No. 4,419,446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente Estadounidense No. 4,601,978. ver También Reyes et al,

Nature 297:598-601 (1982) en la expresión del cADN de β -interferon humanos o en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa a partir del virus herpes simplex. Alternativamente, se puede utilizar el virus Rous Sarcoma Virus largo de repetición terminal como el promotor.

5

Componente de elemento intensificador

[00286] La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de esta invención mediante eucariotes mayores se incrementa frecuentemente al insertar una secuencia intensificadora en el vector. Muchas secuencias intensificadoras se conocen ahora a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albumina, α -feto proteína, y insulina). Típicamente, sin embargo, uno utiliza ría un intensificador a partir de un virus de célula eucariótico. Ejemplos incluyen el intensificador SV40 en el ultimo lado del origen de replicación (bp 100-270), el intensificador del promotor temprano citomegalovirus, intensificador polioma en el lado tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus. Ver También Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) en elementos intensificadores para la activación de promotores eucariótico. El intensificador se puede cortar y empalmar en el vector en la posición 5' o 3' a la secuencia de codificación de anticuerpo, pero se ubica preferiblemente en el sitio 5' del promotor.

20

Componente de terminación de Transcripción

[00287] los vectores de expresión utilizados en células anfitrionas eucarióticas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas a partir de otros organismos multicelulares) También contendrán secuencias necesarias para la terminación de transcripción y para estabilizar el mRNA. Tales secuencias se encuentran disponibles comúnmente de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', regiones no traducidas de ADNs o cADNs vírico o eucariótico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcriptos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase la WO94/1 1026 y el vector de expresión descrito allí.

25

30

Selección y transformación de células anfitrionas

35

[00288] las células anfitrionas adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores aquí son células procariotes, de levaduras, o células eucariote mayores descritas anteriormente. Los procariotes adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tal como organismos Gran-negativos o Gran- positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tal

como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como también *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266,710 publicado el 12 Abril 1989),

5 *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un *E. coli* preferido que clona el anfitrión es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque otras cepas tal como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos a diferencia de ser limitantes.

10 [00289] Anticuerpo de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpo, y fragmentos de anticuerpo se puede producir en bacterias, en particular cuando la glicosilación de la función efectora Fc no es necesaria, tal como cuando se conjuga el anticuerpo terapéutico con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra efectividad en la destrucción de células neoclásicas. Los anticuerpos de longitud completa tienen

15 mayor vida media en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más eficiente en costos. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, ver, por ejemplo, U.S. 5,648,237 (Carter et. al.), U.S. 5,789,199 (Joly et al.), U.S. 5,840,523 (Simmons et al), que describen la región de iniciación de traducción (TIR) y las secuencias de señal para optimizar la expresión y secreción. Véase También Charlton,

20 Métodos in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de pasta de células *E. coli* en una fracción soluble y se pueden purificar a través de, por ejemplo, una columna de G de proteína A que depende del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de manera

25 similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado por ejemplo, en células CHO.

[00290] en adición a los procariotes, los microbios eucarióticos tal como hongos filamentosos o levaduras son anfitriones de clonación y expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común de

30 panadería, es la más comúnmente utilizada entre los microorganismos anfitriones eucarióticos menores. Sin embargo, un número de otro género, especies, y cepas están disponibles comúnmente y son útiles aquí, tal como *Schizosaccharomyces pombe*; anfitriones *Kluyveromyces* tal como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *A. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906), *AT. thermotolerans*, y *AT. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tal como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y anfitriones *Aspergillus* tal como *A. nidulans* y *A. niger*. Para revisar una discusión del uso de las

35

levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004).

[00291] Ciertas cepas de hongos y levaduras se pueden seleccionar en las que se ha "humanizado" las rutas de glicosilación, que resultan en la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Ver, por ejemplo, Li et al, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la ruta de glicosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross et al, supra.

[00292] Las células anfitrionas adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado también se deriva de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrados incluye plantas y células de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y células de anfitriones de insectos permisivos correspondientes de anfitriones tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas víricas para transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus se pueden utilizar como el virus aquí de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[00293] cultivos de células de plantas de algodón, maíz, papa, soya, petunia, tomate, lenteja acuática (*Lemnaceae*), alfalfa (*M. truncatula*), y tabaco también se pueden utilizar como anfitriones. ver, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, y 6,417,429 (que describen tecnologías PL ANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

[00294] se pueden utilizar células de vertebrados como anfitriones, y la propagación de las células de los vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) llega a ser un procedimiento de rutina. Ejemplos de estirpes de células de anfitrión de mamíferos útiles son estirpes CVI de riñón de mono transformadas mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); estirpes de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al, J. Gen virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebe (BHK, ATCC CCL 10); células Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CVI ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón de canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3 A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (WI 38, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón

(MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una estirpe de hepatoma humano (Hep G2). Otras estirpes de células anfitrionas de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células CHO DHFR⁻ (Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); y estirpes de células de mieloma tal como NSO y Sp2/0. Para una revisión de ciertas estirpes de células de anfitrión de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Métodos in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humanosa Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268.

10 [00295] Las células anfitrionas se transforman con la expresión descrita anteriormente o los vectores de clonación para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio de nutriente convencional modificado como apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican la secuencia deseada.

15 Cultivo de células anfitrionas

[00296] las células anfitrionas utiliza das para producir un anticuerpo de esta invención se puede cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente tal como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI- 1640 (Sigma), y medio de Eagle's modificado de Dulbecco's ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células anfitrionas. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos en Ham et al, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al, Anal. BiochemA02:255 (1980), Patentes Estadounidenses 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 Estadounidense Re. 30,985 se pueden utiliza r como medio de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tal como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tal como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), amortiguadores (tal como HEPES), nucleótidos (tal como adenosina y timidina), antibióticos (tal como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos de trazas (Definido como compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario También se puede incluir en concentraciones apropiadas que se conocerían por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tal como temperatura, pH, y similares, son aquellas utiliza das previamente con las células anfitrionas seleccionadas para la expresión, y serán evidentes para la persona medianamente versada en la materia.

Purificación de anticuerpos

[00297] cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos particulados, ya sean células anfitrionas o fragmentos lisados, se remueven, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al, Bio/Technology 10:163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli* en resumen, la pasta celular se descongela en la presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares se pueden remover mediante centrifugación. cuando se secreta el anticuerpo en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran generalmente primero utilizando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

[00298] la composición de anticuerpo preparada a partir de células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis de gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una de las etapas de purificación típicamente preferidas. La adecuación de la proteína A como un ligando de afinidad depende de las especies e isotipo de cualquier dominio Fc inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas gama $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark et al, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss et al, EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se adhiere el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices estables mecánicamente tal como vidrio de poro controlado o poli(stireno-divinil) benceno permiten índices de flujo más rápidos y tiempo de procesamiento más cortos que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tal como fraccionamiento sobre una columna de intercambio de iones, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE™ sobre una resina de intercambio de anión o catión (tal como una columna de ácido poliaspartico), cromatografía de enfoque, SDS-PAGE, y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a ser recuperado.

[00299] luego de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se pueden someter a cromatografías de interacción hidrófoba de pH bajo utilizando un amortiguador de elución en un pH de entre aproximadamente 2.5-4.5, preferiblemente desarrollado a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0- 0.25M de sal).

[00300] en general, varias metodologías para preparar anticuerpos para uso en investigación, pruebas, y clínica se establecen bien en la técnica, consistentes con las metodologías descritas anteriormente y/o consideradas apropiadas por el experto en la técnica para un anticuerpo de interés particular.

Formulaciones Farmacéuticas y Dosificaciones

[00301] La composición de anticuerpo se formulará, dosificará, y administrará en una forma consistente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente efectiva" del anticuerpo al ser administrado se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para evitar, aliviar, o tratar una enfermedad o trastorno. El anticuerpo no necesita ser, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para evitar o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de tal otro agente depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y con rutas de administración como se utiliza aquí o aproximadamente de 1 a 99% de las dosificaciones empleadas aquí. Generalmente, el alivio o el tratamiento de una enfermedad o trastorno involucran la reducción de uno o más síntomas o problemas médicos asociados con la enfermedad o trastorno. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede logra uno o una combinación de lo siguiente: reducir el número de células neoplásicas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, reducir en algún grado y/o detener) la infiltración de células neoplásicas en órganos periféricos; inhibir la metástasis de tumor; inhibir, en algún grado, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. El grado en el que el fármaco pueda evitar el crecimiento y/o muerte de células neoplásicas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En algunas realizaciones, se puede utiliza r una composición de esta invención para evitar el inicio o recurrencia de la enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero.

[00302] para la previsión o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utilice solo o en combinación con uno o más de otros agentes Terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, el tipo de anticuerpo, la severidad curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para propósitos terapéuticos o preventivos, terapia previa, historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una sola vez o durante una serie de tratamientos.

[00303] en ciertas realizaciones, dependiendo del tipo y la severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0.1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. En otra realización, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0.1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se sostiene hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.

[00304] Una dosificación de ejemplo del anticuerpo estaría en el rango de aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. Así, una o más dosis de aproximadamente 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg (o cualquier combinación de estos) se puede administrar al paciente. Tales dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo cada día, cada tres días, cada semana o cada dos a tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). En una realización, la dosis de aproximadamente 10 mg/kg se administra cada tres días. Una mayor dosis de carga inicial, seguida por una o más dosis menores se puede administrar. En una realización, un régimen de dosificación de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación.

[00305] En ciertas realizaciones, los regímenes de dosificación discutidas aquí se utilizan en combinación con un régimen de quimioterapia como la primer línea de terapia para tratar cáncer colorectal metastásico. En algunos aspectos, el régimen de quimioterapia involucra la administración intermitente de altas dosis tradicionales. En otros aspectos, los agentes quimioterapéuticos se administran utilizando dosis más pequeñas y más frecuentes sin interrupción del programa ("quimioterapia metronómica").

[00306] El progreso de la terapia de la invención se monitorea fácilmente mediante técnicas convencionales y ensayos.

5 [00307] El anticuerpo de la invención (y cualquier otro agente o adyuvante terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, que incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonal, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, o
10 subcutánea. Adicionalmente, el anticuerpo se administra en forma adecuada mediante infusión de pulso, particularmente con dosis declinantes del anticuerpo. La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tal como inyección intravenosa o subcutánea, que depende en parte de si la administración es breve o crónica.

15 [00308] las formulaciones farmacéuticas aquí También pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no afectan adversamente una a la otra. Tales moléculas están presentes adecuadamente en combinación en
20 cantidades que son efectivas para el uso propuesto.

[00309] Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para almacenamiento al mezclar el anticuerpo que contiene el grado de pureza deseado con portadores fisiológicamente aceptables opcionales, excipientes o
25 estabilizantes (Remington: The Science y Practice of Pharmacy 20th edition (2000)), en la forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Portadores aceptables, excipientes, o estabilizantes son no tóxicos a los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, en incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; los antioxidantes incluyen ácido
30 ascórbico y metionina; los conservantes (tal como cloruro amonio octadecildimetilbencil; cloruro hexametonio; cloruro benzalconio, cloruro benzetonio; fenol, butilo o alcohol bencilo; alquil parabenos tal como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3- pentanol; y m-cresol); poli péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albumina de suero, gelatina, o
35 inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra inones formadores de sal tal como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína

Zn); y/o tenso activos no iónicos tal como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

5 [00310] los ingredientes activos También se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y poli- (metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albumina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington: The
10 Science y Practice of Pharmacy 20ma edición (2000).

[00311] Las formulaciones a ser utilizadas para administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

15 [00312] Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, cuyas matrices están en la forma de artículos, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2- hidroxietil-
20 metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patentes Estadounidenses No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de vinil etileno no-
degradable, copolímeros de ácido glicólico – ácido láctico degradables tal como LUPRON
DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido glicólico – ácido
láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales
25 como acetato de vinil etileno y ácido glicólico – ácido láctico permiten la liberación de
moléculas durante 100 días, ciertas proteínas liberan hidrogeles ciertos hidrogeles liberan
proteínas durante periodos más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas
permanecen en el cuerpo durante bastante tiempo, ellas pueden desnaturalizarse o
acumularse como un resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una
30 pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden
prever estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo
involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de aglomeración es la
formación de enlaces S-S intermolecular a través de intercambio de tio-disulfuro, puede
alcanzar la estabilización al modificar los residuos sulfhídrico, liofilizando a partir de
35 soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad; utilizando aditivos apropiados, y
desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas.

Métodos

Métodos Terapéuticos

[00313] Un anticuerpo de la invención se puede utilizar en, si por ejemplo, métodos terapéuticos in vitro, ex vivo, y in vivo.

5

[00314] En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, trastorno asociado con expresión incrementada y/o actividad de VEGF) que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento.

10

[00315] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para reducir, inhibir, bloquear, o evitar el crecimiento de un tumor o cáncer, los métodos comprenden administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento.

15

[00316] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir angiogenia que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento.

20

[00317] En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la permeabilidad vascular que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento.

25

[00318] En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar una afección patológica asociada con angiogenia que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con la angiogenia es un tumor, un cáncer, y/o un trastorno celular proliferativo.

30

[00319] Un anticuerpo de la invención se puede administrar a un humano para propósitos terapéuticos. En una realización, se utiliza un anticuerpo de la invención en un método para unir el VEGF en un individuo que sufre un trastorno asociado con la actividad y/o expresión VEGF incrementada, el método comprende administrar al individuo el anticuerpo de tal manera que se una el VEGF en el individuo. En una realización, el VEGF es VEGF humano, y el individuo es un individuo humano. Alternativamente, el individuo puede ser un mamífero que expresa VEGF al que se une un anticuerpo de la invención. Más aun el individuo puede ser un mamífero en el que se ha introducido el VEGF (por ejemplo, mediante administración de VEGF o mediante expresión de un transgen que codifica VEGF).

35

[00320] En un aspecto, por lo menos uno de los anticuerpos de la invención puede unir el VEGF de especies diferentes a la humana. De acuerdo con la anterior, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para unir la actividad de antígeno específica, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen el antígeno con el que tiene una reacción cruzada el anticuerpo de la invención (por ejemplo, chimpancé, mandril, tití, macaco y macaco de la india, cerdo o ratón). En una realización, el anticuerpo de la invención se puede utilizar para inhibir las actividades de antígeno al poner en contacto el anticuerpo con el antígeno de tal manera que se inhibe la actividad del antígeno. Preferiblemente, el antígeno es una molécula de proteína humana.

[00321] Más aun, un anticuerpo de la invención se puede administrar a un mamífero no humano que expresa VEGF con el que tiene reactividad cruzada el anticuerpo (por ejemplo, un primate, cerdo, rata, o ratón) para propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto al último, tales modelos de animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, prueba de dosificación y curso de tiempo de administración).

[00322] Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para tratar, inhibir, retardar la progresión de, evitar/tratar la recurrencia de, aliviar, o evitar enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o actividad de una o más moléculas de antígeno.

[00323] La presente invención abarca la prevención y tratamiento de metástasis de tumor y terapia de cáncer anti-angiogénica, una estrategia de tratamiento del cáncer novedosa dirigida a inhibir el desarrollo de bazo sanguíneo de tumor requeridos para proporcionar nutrientes que soportan el crecimiento del tumor. La invención incluye específicamente la inhibición del crecimiento neoplástico del tumor en el sitio primario así como también evitar y/o tratar la metástasis de los tumores en los sitios secundarios, permitiendo por lo tanto el ataque de tumores por otros agentes terapéuticos. Ejemplos de cáncer a ser tratado (que incluyen prevención) aquí incluye, pero no se limita a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasia linfóide. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluye cáncer de célula epidermoide (por ejemplo, cáncer de célula epidermoide epitelial), cáncer de pulmón que incluye cáncer de microcítico de pulmón, cáncer no microcítico de pulmón, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del perineo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal que incluye cánceres gastrointestinales y cáncer estromal gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorectal, de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer renal o

de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, melanoma de extrusión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginoso acral, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de células B (que incluyen linfoma no Hodgkin folicular de bajo grado (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL folicular de grado intermedio; NHL difuso grado intermedio; NHL inmunoblastico grado alto; NHL linfoblastico grado alto; NHL de célula no dividida pequeña grado alto; NHL de enfermedad de volumen; linfoma de célula de manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblastica aguda (ALL); leucemia de célula capilar; leucemia mieloblastica crónica; y trastornos linfoproliferativos post trasplante (PTLD), así como también proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como aquella asociada con tumor cerebral), síndrome de Meig, cerebro, así como también cáncer de cabeza y cuello, y metástasis asociada. En ciertas realizaciones, los cánceres que son susceptibles al tratamiento por los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer no microcítico de pulmón, linfoma no Hodgkins (NHL), cáncer de célula renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejido blando, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, mesotelioma, y mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer microcítico de pulmón, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorectal (CRC), y carcinoma hepatocelular. Aun, en algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer no microcítico de pulmón, cáncer colorectal y carcinoma de mama, que incluye formas metastaticas de aquellos canceres.

[00324] en ciertas realizaciones, se administra un immunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos al paciente. En algunas realizaciones, el immunoconjugado y/o antigen al que se une se internalice por la célula, resultando en eficacia terapéutica incrementada del immunoconjugado en la muerte de la célula objetivo a la que se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con el acido nucleico en la célula objetivo. En una realización, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con la polimerización de microtubulo. Ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos listados aquí (tal como maitansinoide, auristatina, dolastatina, o una caliquiamicina), un isotopo radioactivo, o una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN.

[00325] cuando el objetivo de un anticuerpo se ubica en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención el anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica. Existen varios métodos conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de la barrera

hematoencefálica, que incluye, pero no se limita a, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre, y receptores y métodos basados en canal.

[00326] los métodos físicos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, rodear completamente la barrera hematoencefálica, o crear aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de circunvención, incluyen, pero no se limitan a, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou et al, Gene Therapy 9: 398-406 (2002)), suministro mejorado infusión/convección interfacial (véase, por ejemplo, Bobo et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91: 2076-2080 (1994)), e implantar un dispositivo de suministro en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aberturas en el cerebro incluyen, pero no se limitan a, ultrasonido (véase, por ejemplo, publicación de patente estadounidense No. 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier y its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989)), permeabilización mediante, por ejemplo, bradiquinina o permeabilizar A-7 (véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 5,112,596, 5,268,164, 5,506,206, y 5,686,416), y transfección de neuronas que montan la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, U.S. publicación de patente estadounidense No. 2003/0083299). [00327] métodos basados en lípidos de transponer anticuerpo a través de la barrera incluye, pero no se limita a, encapsular el anticuerpo en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión de anticuerpo que se unan a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense No. 20020025313), y que contiene el anticuerpo en partículas de lipoproteína de baja densidad (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense No. 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, publicación de patente estadounidense No. 20040131692).

[00328] Los métodos basados en células madre de trasponer un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica que implica células progenitoras neuronales construidas con ingeniería genética (NPCs) para expresar el anticuerpo de interés y luego implantarlo y luego implantar las células madre en el cerebro del individuo a ser tratado. Véase Behrstock et al. (2005) Gene Ther. 15 Dec. 2005 publicación en línea avanzada (reportando que el NPC construido con ingeniería genética expresa los síntomas reducidos GDNF del factor neurotrópico de la enfermedad de Parkinson cuando se implanta en los cerebros de roedores y primates).

[00329] Los métodos de transporte de un anticuerpo basados en canal y receptor a través de la barrera hematoencefálica incluye, pero no se limita a, utilización de bloqueadores glucocorticoides para incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activando los canales de potasio (véase, por ejemplo, IJ. S. publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2005/0089473), que inhibe transportadores de fármaco ABC (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2003/0073713); recubrimiento de anticuerpos con una actividad de modulación y transferrina de uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2003/0129186), y cationizar los anticuerpos (véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 5,004,697).

[00330] se entiende que cualquiera de los anteriores métodos terapéuticos se pueden llevar a cabo utilizando un immunoconjugado de la invención en lugar de o en adición a un anticuerpo anti-VEGF.

Terapias de combinación

[00331] se pueden utilizar anticuerpos de la invención ya sean solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede co-administrar con otro anticuerpo, agentes quimioterapéuticos (que incluyen cocteles de agentes quimioterapéuticos), otros agentes citotóxicos, agentes anti-angiogénicos, citocinas, y/o agentes inhibidores del crecimiento. Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento del tumor, puede ser particularmente deseable combinarlo co uno o más de otros agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento del tumor, por ejemplo, agentes anti-angiogénicos y/o agentes quimioterapéuticos. Alternativamente, o adicionalmente, el paciente puede recibir terapia de radiación (por ejemplo irradiación de rayos externos o terapia con agente etiquetado radiactivo, tal como un anticuerpo). Tales terapias combinadas enumeradas anteriormente incluyen la administración combinada (cuando dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir antes de, y/o luego, de la administración de la terapia o terapias.

[00332] Una realización, un anticuerpo de la invención puede ser co- administrar con por lo menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Por ejemplo, se utilizan anticuerpos anti-VEGF en combinaciones con terapéuticos anti-cáncer o terapéuticos anti-neo vascularización para tratar varias condiciones neoplásicas o no neoplásicas. En una realización, las afecciones neoplásicas o no neoplásicas se caracterizan por trastornos

patológicos asociados con la angiogenia aberrante o indeseada. El anticuerpo anti-VEGF se puede administrar seriamente o en combinación con otros agentes que es efectivo para aquellos propósitos, ya sea en la misma composición o como composiciones separadas. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden administrar múltiples inhibidores múltiples del VEGF.

[00333] Típicamente, los anticuerpos anti-VEGF y los agentes anti-cáncer son adecuados para las mismas enfermedades o enfermedades similares para bloquear o reducir un trastorno patológico tal como un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular. En una realización el agente anti cáncer es un agente anti-angiogénico.

[00334] se han identificado muchos agentes antiangiogénicos y se conocen en la técnica, incluyendo aquellos listados aquí, por ejemplo, listado en la sección "Definiciones", y por, por ejemplo, Carmeliet and Jain, Nature 407:249-257 (2000); Ferrara et al, Nature Reviews: Drug Discovery, 3:391-400 (2004); y Sato Int. J. Clin. Oncol, 8:200-206 (2003). Ver también, Solicitud de Patente Estadounidense US20030055006.

[00335] En una realización, un anti-VEGF de la presente invención se utiliza en combinación con uno o más anticuerpos neutralizantes anti-VEGF (o fragmentos), antagonista a otra familia VEGF (por ejemplo, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, factor de crecimiento placentario (PLGF)) o un antagonista del receptor VEGF que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, receptor VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, fragmentos de neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de tirosinas cinasas VEGFR (RTK), estrategias anticodificantes para VEGF, ribozimas contra VEGF o receptores VEGF, variantes de antagonista de VEGF; y cualquier combinación de los mismos.

[00336] En otra realización, al anticuerpo anticuerpo anti-VEGF de la invención se puede utilizar en combinación con inhibidores de tirosina cinasa de receptor de molécula pequeña (RTKI) que van dirigidos a uno o más receptores de tirosina cinasa tal como receptores VEGF, receptores FGF, receptores EGF y receptores PDGF. Se conocen en la técnica muchas moléculas pequeñas terapéuticas RTKI, que incluyen, pero no se limitan a, vatalanib (PTK787), erlotinib (TARCEV A[®]), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA[®]), ZD6126 (ANG453), ZDI 839, sunitinib (SUTENT[®]), semaxanib (SU5416), AMG706, AG013736, Imatinib (GLEEVEC[®]), MLN-518, CEP-701, PKC- 412, Lapatinib (GSK572016), VELCADE[®], AZD2171, sorafenib (NEXA V AR[®]), XL880, y CHIR-265.

[00337] Otros agentes terapéuticos útiles para combinación de terapia de tumor con el anticuerpo de la invención incluyen antagonistas de otros factores que están involucrados en el crecimiento de tumor, tal como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2) ErbB3, ErbB4, o TNF.

5

[00338] En ciertas realizaciones, dos o más inhibidores de angiogenia se puede coadministrar opcionalmente al paciente en adición a los antagonistas VEGF y otro agente. En todavía otra realización, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes antineoplásico se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-VEGF de la presente invención, un antagonista a otra familia de VEGF, y/o un agente anti- angioénico.

10

[00339] En ciertos aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para combinación de terapia de tumor con un anticuerpo anti-VEGF incluyen otras trepáis de cáncer (por ejemplo, cirugía, tratamientos radiológicos (por ejemplo, que involucran irradiación o administración de sustancias radioactivas), quimioterapia, tratamiento con agentes antineoplásico enumerados aquí y conocidos en la técnica, o combinaciones de los mismos). Una lista no limitante de ejemplo de agentes quimioterapéuticos contemplados se suministra aquí en la sección "Definiciones."

15

20

[00340] Alternativamente, o adicionalmente, dos o más anticuerpos que unen el mismo o dos antígenos diferentes descritos aquí se pueden coadministrar al paciente. Algunas veces, puede ser benéfico también administrar una o más citocinas al paciente.

25

[00341] Las cantidades efectivas de agentes terapéuticos administrados en combinación con un anticuerpo anti-VEGF estarán a discreción del médico o veterinario. La administración y ajuste de la dosificación se hace para alcanzar el manejo máximo de las afecciones a ser tratadas. La dosis dependerá de factores tal como el tipo de agente terapéutico a ser utilizado y el paciente específico que se trata. Las dosificaciones para el agente antineoplásico son aquellas utilizadas actualmente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente antineoplásico y el anticuerpo anti- VEGF. En ciertas realizaciones, la combinación de los inhibidores potencia la eficacia de un único inhibidor. El término "potencia" se refiere a una mejora en la eficacia de un agente terapéutico en su dosis común o aprobada. Ver también aquí la sección titulada

30

35

Formulaciones Farmacéuticas y Dosificación.

Agentes quimioterapéuticos

[00342] En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar un trastorno (tal como un tumor, un cáncer, o un trastorno celular proliferativo) al administrar cantidades efectivas de un anticuerpo anti-VEGF y/o un inhibidor de angiogenia y uno o más agentes quimioterapéuticos. Se puede utilizar una variedad de agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Una lista de ejemplo y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados se proporciona aquí en la "Definiciones." La administración del anticuerpo anti-VEGF y el agente quimioterapéutico se puede hacer simultáneamente, por ejemplo, como una única composición o como dos o más composiciones distintas, utilizando la misma ruta de administración o diferente ruta de administración. Alternativamente, o adicionalmente, la administración se puede hacer secuencialmente, en cualquier orden. Alternativamente, o adicionalmente, las etapas se pueden desarrollar como una combinación de ambas secuencialmente y simultáneamente, en cualquier orden. En ciertas realizaciones, los intervalos varían de minutos a días, a semanas a meses, que se pueden presentar entre las administraciones de dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico se puede administrar primero, seguido por el anticuerpo anti-VEGF. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del primer anticuerpo anti-VEGF. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un anticuerpo anti-VEGF (tal como B20- 4.1.1 o anticuerpo B20-4.1.1RR), seguido por la administración de un agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, los intervalos varían de minutos a días, a semanas a meses, pueden estar presentes entre las administraciones de dos o más composiciones.

[00343] Como entenderán aquellas personas medianamente versadas en la técnica, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos generalmente estarán alrededor de aquellas ya empleadas en terapias químicas en donde se administran quimioterapéuticos solos o en combinación con otros quimioterapéuticos. La variación de la dosificación ocurrirá probablemente dependiendo de la afección que se trata. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Caída de Crecimiento de Tumor

[00344] La invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir la recaída del crecimiento de tumor o recaída de crecimiento de células neoplásicas. La recaída del crecimiento del tumor o recaída del crecimiento de células neoplásicas se utiliza para describir una afección en la que los pacientes que sufren o se

tratan con una o más terapias disponibles actualmente (por ejemplo, terapias contra el cáncer, tal como quimioterapia, terapia de radiación, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia de anticuerpo anti-VEGF, particularmente un régimen terapéutico estándar para el cáncer particular) no es clínicamente adecuado tratar los

5 pacientes o los pacientes no reciben más ningún efecto benéfico de la terapia de tal manera que estos pacientes necesitan terapia efectiva adicional. Como se utiliza aquí, la frase también se puede referir a una afección del paciente “no se sensible/refractario” por ejemplo, que describe pacientes que responden a la terapia y sufre aún de efectos colaterales, resistencia al desarrollo, no responden a la terapia, no responden

10 satisfactoriamente a la terapia, etc. En varias realizaciones, un cáncer es la recaída del crecimiento del tumor o recaída de crecimiento de célula neoplásica en donde el número de células cancerosas no se ha reducido significativamente, o se ha incrementado, o el tamaño del tumor no se ha reducido significativamente, o ha incrementado, o falla en cualquier reducción adicional en el tamaño o en el número de las células neoplásicas. La

15 determinación de si las células neoplásicas tienen recaída de crecimiento de tumor o recaída de crecimiento de células neoplásicas se puede hacer in vivo o in vitro mediante cualquier método conocido en la técnica para ensayar la efectividad del tratamiento de las células neoplásicas, utilizando los significados aceptados en la técnica de “recaída” o “refractario” o “no sensible” en tal contexto. Un tumor resistente al tratamiento anti-VEGF

20 es un ejemplo de una recaída de crecimiento de tumor.

[00345] La invención proporciona métodos para bloquear o reducir la recaída del crecimiento de tumor o recaída de crecimiento de célula neoplásica en un sujeto al administra uno o más anticuerpos anti-VEGF de la presente invención para bloquear o

25 reducir la recaída de crecimiento de tumor o la recaída de crecimiento de célula neoplásica en un sujeto. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se puede administrar posteriormente al terapéutico de cáncer. En ciertas realizaciones, se administran anticuerpos anti-VEGF simultáneamente con terapia contra el cáncer. Alternativamente, o

30 adicionalmente, la terapia de anticuerpo anti-VEGF alterna con otra terapia de cáncer, que se puede desarrollar en cualquier orden. La invención también abarca métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para evitar el inicio de la recurrencia del cáncer en pacientes predispuestos a tener cáncer. Generalmente, el sujeto está o experimenta actualmente terapia de contra el cáncer. En una realización, la terapia contra

35 el cáncer es el tratamiento con un agente anti-angiogénico, por ejemplo, un antagonista VEGF-C. El agente anti-angiogénico incluye, pero no se limita a aquellos conocidos en la técnica y encontrados bajo la sección "Definiciones". En una realización, el agente anti-angiogénico está en un anticuerpo o fragmento neutralizante anti-VEGF (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Ver, por ejemplo, Patentes Estadounidenses 6,582,959, 6,884,879,

6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1 ; Solicitudes de Patente Estadounidenses 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; Popkov et al, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); y, WO2005012359. Se pueden administrar agentes adicionales en combinación con anticuerpo anti-VEGF para bloquear o reducir la recaída de crecimiento de tumor o la recaída de crecimiento de célula neoplásica, por ejemplo, véase la sección titulada Terapias de Combinación.

Métodos de diagnóstico y métodos de detección.

[00346] En un aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión incrementada del VEGF. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-VEGF; determinar el nivel de expresión (ya sea cualitativamente o cuantitativamente) del VEGF mediante la célula de prueba al detectar la unión del anticuerpo anti-VEGF con VEGF; y comparar el nivel de expresión del VEGF mediante célula de prueba con el nivel de expresión del VEGF con una células de control (por ejemplo, una célula normal del mismo tejido de origen que en la célula de prueba o una célula que expresa VEGF en niveles comparables a tal célula normal), en donde un mayor nivel de expresión del VEGF mediante la célula de prueba según se compara con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado la expresión incrementada del VEGF. En ciertas realizaciones, la célula de prueba se obtiene a partir de un individuo que se sospecha que tiene un trastorno asociado con la expresión incrementada del VEGF. En ciertas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer, y/o trastorno proliferativo celular.

[00347] Trastornos de ejemplo que se pueden diagnosticar utilizando un anticuerpo de la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células epidermoides, cáncer microcítico de pulmón, cáncer no microcítico de pulmón, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma epidermoide de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer del estromal gastrointestinales, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer verrical, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma uterino o endometrial, carcinoma de glándulas salivales, o cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata , cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello y, melanoma, melanoma de dispersión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginoso acrales, melanoma nodular, linfoma de células B, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia de célula capilar, leucemia mieloblástica crónica, trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema asociado con tumor cerebral y síndrome de Meigs.

[00348] En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF descritos aquí y VEGF. En algunas realizaciones, el complejo es en vivo o in vitro. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula neoplásica.

5

[00349] En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de VEGF en una muestra biológica. El término "detectar" como se utiliza aquí abarca la detección cualitativa o cuantitativa.

10

[00350] En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-VEGF bajo condiciones permisivas para unir el anticuerpo al anti-VEGF al VEGF, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-VEGF y el VEGF.

15

[00351] Se pueden utilizar anticuerpos anti-VEGF para la detección del VEGF en uno cualquiera de un número de métodos de ensayo de detección bien conocidos. Por ejemplo, se puede ensayar una muestra biológica para el VEGF al obtener la muestra a partir de una fuente deseada, mezclar la muestra con anticuerpo anti-VEGF para permitir que el anticuerpo forme el complejo anticuerpo/VEGF con cualquier VEGF presente en la mezcla, y detectar cualquier complejo de anticuerpo/VEGF presente en la mezcla. La muestra biológica se puede preparar para ensayo mediante métodos conocidos en la técnica que son adecuados para la muestra en particular. Los métodos de mezcla de la muestra con anticuerpos y los métodos para detectar el complejo de anticuerpo/VEGF se seleccionan de acuerdo con el tipo de ensayo utilizado.

20

[00352] Métodos analíticos para VEGF todos utilizan uno o más de los siguientes reactivos: análogo VEGF etiquetados, análogos VEGF inmovilizado, anticuerpo anti-VEGF etiquetado, anticuerpo anti-VEGF inmovilizado y/o conjugados estéricos. Los reactivos etiquetados también se conocen como "trazadores."

25

[00353] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF se etiqueta de manera detectable. La etiqueta utilizada es cualquier funcionalidad detectable que no interfiere con la unión del VEGF y el anticuerpo anti-VEGF. Las etiquetas incluyen, pero no se limitan a, etiquetas o grupos funcionales que se detectan directamente (tal como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, de densidad de electrones, quimioluminescentes, y radioactivas), así como también grupos funcionales, tal como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Las etiquetas de ejemplos incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I , los fluoróforos tal como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus

30

35

derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patentes Estadounidenses No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidrophthalazinedionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacaridas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tal como uricasa y oxidasa xantina, acopladas con unas enzimas que emplea peróxido de hidrogeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas de giro, etiquetas bacteriófago, radicales libres estables, y similares.

[00354] Están disponibles métodos convencionales para unir estas etiquetas covalentemente a proteínas o a polipéptidos. Por ejemplo, agentes de acoplamiento tal como dialdehidos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, bencilina bis-diazotizada, y similares se pueden utilizar para etiquetar los anticuerpos con la etiqueta fluorescente, quimioluminescente, y de enzima descrita anteriormente. Ver, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 3,940,475 (fluorimetria) y 3,645,090 (enzimas); Hunter et al., *Nature*, 144: 945 (1962); David et al, *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Metodos*, 40: 219-230 (1981); y Nygren, *J. Histochem. y Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Las etiquetas preferidas aquí son enzimas tal como peroxidasa de rábano y fosfatasa alcalina. La conjugación de tales etiquetas, incluyendo las enzimas, con los anticuerpos es un procedimiento de manipulación estándar para una persona medianamente versada en el arte en técnicas de inmunoensayos. Ver, por ejemplo, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzima-antibody Conjugates for Use in Enzima Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, ed. Jj. Langone and H. van vunkakis, vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

[00355] En ciertas realizaciones, los anticuerpos se inmovilizan sobre una matriz insoluble. La insolubilización se puede dirigir a la separación de un anticuerpo anti-VEGF de cualquier VEGF que permanece libre en solución. Esta se logra convencionalmente al insolubilizar el anticuerpo anti-VEGF antes del procedimiento de ensayo, como mediante absorción a una superficie o matriz insoluble en agua (Bennich et al, U.S. 3,720,760), o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando reticulación de glutaraldehído), o al insolubilizar el anticuerpo anti-VEGF después de formación de un complejo entre el anticuerpo anti- VEGF y el VEGF, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

[00356] Los ensayos utilizados para detectar la unión de anticuerpo anti-VEGF al VEGF incluye, pero no se limitan a, ensayos de unión a antígeno que se conocen bien en la técnica, tal como western blots, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente inmunizado ligado a enzima), ensayo de "intercalamiento" y competitivos, ensayos de

inmunoprecipitación, ensayos inmunofluorescentes, inmunoensayos de proteína A, ensayos de inmunohistoquímica (IHC) y ensayos de inhibición estérica.

[00357] En una realización, la expresión de proteína en una muestra se puede examinar
 5 utilizando protocolos de inmunohistoquímica y tenido. El teñido inmunohistoquímico de las secciones de tejido se ha mostrado que son un método confiable para evaluar o detectar la presencia de proteína en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares in situ, generalmente mediante métodos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de la muestra, se
 10 puede utilizar un tejido o muestra de célula de un mamífero (típicamente un paciente humano). Ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, células de cáncer tal como colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma, y células de cáncer de leucemia. La muestra se puede obtener mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluye; pero no se limita a excusión quirúrgica, aspiración o
 15 biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija y se coloca en parafina o similares. La muestra de tejido se puede fijar (es decir, preservar) mediante metodología convencional. Un experto en la técnica apreciará que la elección de un fijador se determina mediante el propósito para el que la mezcla se tiñe histológicamente o se analiza de otra forma. Una persona medianamente versada en la
 20 técnica también apreciará que la longitud de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador utilizado.

[00358] El IHC se puede desarrollar en combinación con técnicas adicionales tales como teñido morfológico y/o hibridación de fluorescencia in-situ. Hay dos métodos generales de
 25 IHC disponibles; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión de un anticuerpo al antígeno objetivo (por ejemplo, VEGF) se determina directamente. Este ensayo directo utiliza un reactivo etiquetado, tal como una etiqueta fluorescente o un anticuerpo primario etiquetado en enzima, que se puede visualizar sin interacción de anticuerpo adicional. En un ensayo típico indirecto, el anticuerpo primario no conjugado se
 30 une al antígeno y luego un anticuerpo secundario etiquetado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga con una etiqueta enzimática, se agrega un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de señal ocurre debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítomos en el anticuerpo primario. El anticuerpo
 35 primario y/o secundario utilizado para inmunohistoquímica se etiquetará típicamente con un grupo funcional detectable.

[00359] a pesar de los procedimientos de preparación de muestras discutidas anteriormente, el tratamiento adicional de la sección de tejido antes de, durante y luego

del IHC puede ser deseable. Por ejemplo, métodos de recuperación de epítipo, tal como el calentamiento de la muestra de tejido en amortiguador de citrato se puede llevar a cabo (ver, por ejemplo, Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

5 [00360] Luego de una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a anticuerpo primario durante un periodo suficiente y bajo condiciones adecuadas de tal manera que el anticuerpo primario se une al antígeno de proteína objetivo en la muestra de tejido. Las condiciones apropiadas para alcanzar esto se pueden determinar mediante experimentación de rutina. El grado de unión del anticuerpo a la muestra se determina al
10 utilizan una cualquiera de las etiquetas detectable discutidas anteriormente. Preferiblemente, la etiqueta es una etiqueta enzimática (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico sustrato tal como el cromogen 3,3'-diaminobenzidina. Preferiblemente la etiqueta enzimática se conjuga con un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo anti-conejo de cabra).

[00361] Los especímenes así preparados se puede montar y cubrir con un porta objetos. La evaluación del portaobjeto se determina luego, por ejemplo, utilizando un microscopio,
20 y criterio de intensidad de tñido, que se puede emplear de manera rutinaria en la técnica para evaluar el criterio de intensidad de tñido como sigue:

TABLA 2

Patrón de tñido	Clasificación
No se observa tñido en las células	0
Se detecta tñido escasamente perceptible en más de 10% de las células	1+
Se observa tñido débil a moderado en más de 10% de las células	2+
Se observa tñido moderado a fuerte en más de 10% de las células	3+

25 [00362] Típicamente, una clasificación de patrón de tñido de aproximadamente 2+ o más en un ensayo IHC es diagnóstico y/o pronóstico. En algunas realizaciones, una clasificación de patrones de tñido de aproximadamente 1+ o más es diagnóstico y/o pronóstico. V, una clasificación de patrón de tñido de aproximadamente 3 o más es diagnóstico y/o pronóstico. Se entiende que cuando las células y/o tejido de un tumor o
30 adenoma de colon se examinan utilizando IHC, el tñido se determina generalmente o evalúa en células de tumor y/o tejido (opuesto al tejido circundante o estromal que puede estar presente en la muestra).

[00363] Otros métodos de ensayos, conocidos como ensayos de captación o competitivos, se establecen bien y se utilizan ampliamente en la industria de diagnóstico comercial.

5 [00364] Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un trazador análogo VEGF para competir con la muestra de prueba VEGF para un número limitado de sitios de unión antígeno anticuerpo anti-VEGF. El anticuerpo anti-VEGF generalmente se insolubiliza antes o después de la terminación y luego el trazador y VEGF unidos al anticuerpo anti-VEGF se separan del trazador no unido y el VEGF. Esta separación se
10 logra al decantar (cuando el socio de unión se preinsolubiliza) o al centrifugar (cuando el socio de unión se precipita después de reacción competitiva). La cantidad de muestra de prueba VEGF es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unido según se mide por la cantidad de sustancia marcadora. Las curvas de respuestas de dosis con cantidades conocidas de VEGF se preparan y comparan con los resultados de prueba
15 para determinar cuantitativamente la cantidad de VEGF presente en la muestra de prueba. Estos ensayos se denominan Sistemas ELISA cuando se utilizan enzimas como marcadores detectables.

[00365] Otra especie de ensayo competitivo, denominado ensayo "homogéneo", no
20 requiere una separación de fase. Aquí, un conjugado de una enzima con el VEGF se prepara y utiliza de tal manera que anticuerpo anti-VEGF se une al VEGF en la presencia del anticuerpo anti-VEGF que modifica la actividad de enzima. En este caso, el VEGF o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico bifuncional a una enzima tal como peroxidasa. Los conjugados se seleccionan para uso
25 con el anticuerpo anti-VEGF de tal manera que la unión del anticuerpo anti-VEGF inhibe o potencia la actividad de enzima de la etiqueta. Este método per se es ampliamente practicado bajo el nombre de EMIT.

[00366] Se Utilizan conjugados estéricos en métodos de obstáculo estéricos para ensayo
30 homogéneo. Estos conjugados se sintetizan al ligar covalentemente un hapteno de bajo peso molecular con un fragmento VEGF de tal manera que el anticuerpo al hapteno es incapaz sustancialmente de unir el conjugado al mismo tiempo que el anticuerpo anti-VEGF. De acuerdo con este procedimiento de ensayo el VEGF presente en la muestra de prueba unirá el anticuerpo anti-VEGF, permitiendo por lo tanto que el anti-hapteno se una
35 tal conjugado, lo que resulta en un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

[00367] Los ensayos de captación son particularmente útiles para la determinación de anticuerpos VEGF o anti-VEGF. En ensayo de captación secuencial se utiliza un

anticuerpo anti- VEGF inmovilizado para adsorber la muestra de prueba VEGF, la muestra de prueba se remueve mediante lavado, el VEGF unido se utiliza para adsorber un segundo anticuerpo anti-VEGF etiquetado y el material unido se separa luego del trazador residual. La cantidad de trazador unido es directamente proporcional a la muestra de prueba VEGF. En ensayo de captación "simultáneos" la muestra de prueba no se separa antes de agregar el anti-VEGF etiquetado. Un ensayo de captación secuencial utilizando un anticuerpo monoclonal anti-VEGF como el anticuerpo y un anticuerpo anti-VEGF policlonal como el otro es útil en muestras de prueba para VEGF.

10 [00368] Los anteriores son ensayos de detección únicamente de ejemplo para VEGF. Otros métodos se desarrollan ahora que utilizan anticuerpo anti-VEGF para la determinación de VEGF que se incluyen dentro del alcance de ésta.

15 [00369] Se entiende que cualquiera de las realizaciones de diagnóstico anteriores o de detección se pueden llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o en adición a un anticuerpo anti-VEGF.

Artículos de fabricación

20 [00370] En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o inserto de paquete en o asociado con el contenedor. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los contenedores se pueden formar a partir de una variedad de materiales tal como vidrio o plástico. El contenedor aloja una composición que es en sí misma combinada con otra composición efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable por una aguja para inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. La etiqueta o inserto de paquete indica que la composición se utiliza para tratar la afección de elección. Más aún, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida allí, en donde la composición comprende un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición

35 Contenida allí, en donde la composición comprende un agente terapéutico citotóxico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un inserto de paquete que indica que la composición se puede utilizar para tratar una afección particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente (o tercero) que

comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacterioestática para inyección (BWFI), salina amortiguada con fosfato-, solución de Ringer's y solución de dextrosa. Esta puede incluir adicionalmente otros materiales deseables a partir de un punto de vista comercial y de usuario. Que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

[00371] Los siguientes ejemplos están destinados únicamente a ilustrar la práctica de la presente invención que no se proporcionan por vía de limitación. La descripción de todas las patentes y bibliografías científicas citada aquí se incorpora expresamente en su totalidad como referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1
Generación y caracterización de anticuerpo anti-VEGF

[00372] Las colecciones de anticuerpo de fago sintéticas se constituyen en una única estructura (anticuerpo anti-ErbB2 humanizado, 4D5) al introducir diversidad dentro de las regiones que determinan la complementariedad (CDR) de cadenas ligeras y pesadas (Lee, C. v. et al. J Mol Biol 340, 1073-93 (2004)). En resumen, las colecciones de anticuerpo sintético que presentan fago se constituyen en una única estructura humana al introducir la diversidad sintética en posiciones expuestas de solvente dentro de las regiones que determinan complementariedad de cadena pesada s (CDR). Para mejorar el desempeño de las colecciones, las colecciones de fragmento de unión a antígeno monovalentes y bivalentes (Fab) se construyen, y exploran diferente diversidad CDR-H3 al variar la composición de aminoácido y la longitud CDR. La colección se expande luego al incrementar la variabilidad de la longitud CDR-H3 y utilizando codones dirigidos que imitan la composición de aminoácido de las secuencias CDR-H3 naturales. Utilizando estas colecciones con CDR completamente sintético presentadas en un único andamio se genera anticuerpos de alta afinidad. Para detalles adicionales de estrategias y métodos para generar colecciones de anticuerpo sintéticos con única plantilla, ver, por ejemplo, la WO 2005/012359 publicado en Febrero 10, 2005, cuya descripción completa se incorpora expresamente aquí como referencia.

[00373] El paneo de la fase de solución con colecciones neófitas se desarrolla contra VEGF de murino biotinilizado en solución y luego capturado mediante 5ug/ml de neutravidina inmovilizada en inmunoplasmas MaxiSorp™. Después de tres rondas de selección con concentración reducida de VEGF murino biotinilizado, los clones se seleccionan aleatoriamente y se identifican aglutinantes específicos utilizando ELISA fago. Para cada clon de fago positivo, las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas se

subclonan en vectores de expresión pRK que se construyen con ingeniería para expresar cadena IgG de longitud completa. Las construcciones de cadena pesada y cadena ligera se co-transfectan en células CHO o 293, y los anticuerpos expresados se purifican a partir de medio libre de suero utilizando columna de afinidad de proteína A. para la maduración por afinidad, las colecciones de fago con diferente combinación de bucles CDR (CDR-H1 y H2, CDR-L1, L2 y L3) derivados del clon inicial de interés se construye mediante estrategia de aleatorización suave de tal manera que cada posición seleccionada se muta a un residuo tipo diferente al natural o se mantiene como de tipo natural en aproximadamente en una frecuencia 50:50 (Lee, C. et al, Blood, 108:3103-3111, 2006). Luego se identifican clones de alta afinidad a través de cuatro rondas de paneo de fase de solución contra VEGF humano biotinilado como se describe. La concentración de antígeno biotinilado decreciente permite más rigurosidad en el paneo.

Ejemplo 2

15 Afinidades de unión de anticuerpo anti-VEGF

[00374] Para determinar las afinidades de unión los IgG anti -VEGF, se utiliza la medición por resonancia de plasmón de superficie (SRP) con un instrumento BIAcore™-3000. Se activan chips biosensores de dextran carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-clorohidrato de carbodiimida (EDC) y N- hidroxisuccinimida (VHS) de acuerdo con las intrusiones del proveedor. Se inmoviliza el VEGF humano o de murino para lograr aproximadamente 60 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Ver Figura 10. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en series de dos de IgG anti-VEGF (7.8 nM a 500 nM) se inyecta por separado en amortiguador PBT (PBS con 0.05% (v/v) Tween 20) a 37°C con un índice de flujo de 25 µl/min. Los índices de asociación (k_{on}) e índices de disociación (k_{off}) se calcula un modelo de unión bivalente (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{on}/k_{off} .

[00375] Debido al índice off no medible de B20.4.1, el IgG se inmoviliza para lograr aproximadamente 1000 unidades de respuestas (RU) de proteína acoplada.

Ver Figura 11. Diluciones en series de dos de VEGF humano o de murino (7.8nM a 500nM) se inyecta en amortiguador PBT (PBS con 0.05% (v/v) Tween 20) a 37°C con un índice de flujo de 25µl/min. Los índices de asociación (k_{on}) e índices de disociación (k_{off}) se calcula utilizando un modelo de unión uno a uno Langmuir (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2). Para obtener la constante de disociación de equilibrio (K_d).

Ejemplo 3

Ensayo de incorporación de timidina HUVEC

[00376] Para estudiar la función de los anticuerpos anti- VEGF al inhibir la proliferación celular inducida por VEGF, se desarrollan el ensayo de incorporación de timidina HUVEC. Se hacen crecer y se ensayan células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Clontech, Mountain view, CA) como se describió. Se colocan en placas aproximadamente 3000 HUVEC en cada pozo de una placa de cultivo de 96 pozo y se incuban en un medio Eagle's modificado Dulbecco's (DMEM)/F12 complementado con 1.5% (v/v) de suero bovino fetal (medio de ensayo) durante 18 horas. El medio de ensayo fresco con cantidades fijas de VEGF humano (concentración final 0.1 nM), se determina primero al titrar VEGF que puede estimular la síntesis de ADN submáxima, e incrementar las concentraciones de IgG anti- VEGF que se agregan luego a la célula. Después de incubación a 37°C durante 18 horas, se pulsan las células con 0.5 μ Ci/pozo de [^{3} H] timidina durante 24 horas y se cosechan para conteo con contador de centelleo de microplaca TopCount como se describió.

[00377] El ensayo de incorporación de timidina HUVEC muestra que las variantes B20 pueden inhibir efectivamente la proliferación de células HUVEC. La Figura 12 muestra que el B20-4.1.1 y B20-4.1.1 RR tienen similar inhibición con G6-31.

Ejemplo 4

Ensayo de proliferación celular Endotelial

[00378] Para determinar la especificidad de unión y la actividad de bloqueo de B20- 4.1.1, se desarrolla un ensayo basado en una célula utilizando células endoteliales microvasculares retíneas de bovino (BRME), en donde el anticuerpo se prueba por su capacidad para bloquear la proliferación de células inducidas VEGF humano o de murino. BRME se siembra a una densidad de 500 células/pozos en 96-pozos en medio de crecimiento (DMEM de baja -glucosa complementado con 10% de suero de becerro, 2 mM de glutamina, y antibióticos). Para ensayo de inhibición, el B20-4.1.1 se agrega en la concentración indicada (ng/ml) a pozos por triplicado (Figura 13). Después de 0.5 horas, VEGF-A humanos (h VEGF) o VEGF-A (mVEGF) de ratón se agrega a una concentración final de 6 ng/ml. Después de seis o siete días, se determina el crecimiento celular mediante azul Alamar (BioSource; Invitrogen). La Fluorescencia se monitorea en longitud de onda de excitación de 530 nm y 590 nm de longitud de onda de emisión.

[00379] como se muestra en la Figura 13, el B20-4.1.1 reduce la capacidad del hVEGF y el mVEGF para promover la proliferación BRME. Como se muestra en la Figura 16, el anticuerpo avastina reduce la capacidad del hVEGF para promover la proliferación BRME.

El anticuerpo avastina no inhibe la proliferación producida por mVEGF ya que la inhibición de mVEGF no se observa una concentración de hasta 1500 nM de anticuerpo avastina.

Ejemplo 5

5 Estudios in vivo de Inhibición de tumor

[00380] Células A549 (células de cáncer de pulmón humano) y células MDA-MB231 (células de cáncer de mama humano) se hacen crecer en medio de cultivo celular y se inyectan subcutáneamente en ratones sin pelo beige de 8- a 12-semanas de de vida en una densidad células de $\sim 5 \times 10^6$ células/ratón. Cuarenta y ocho horas después de la inoculación de las células de tumor o cuando el tumor alcanza aproximadamente 200 mm³ de tamaño, se inyectan ratones (n=10) intraperitonealmente con B20-4.1.1 a una concentración de 5 mg/kg o con amortiguador de vehículo. Los anticuerpos se administran dos veces semanalmente después. Se mide el volumen de tumor con calibradores en los momentos de tiempo indicado.

15

[00381] Como se muestra en las Figuras 14 y 15, el B20-4.1.1 es efectivo en reducir volúmenes de tumor en ratones inyectados con células A549 (Figura 14) o células MDA-MB231 (Figura 15).

20

[00382] aunque en la anterior descripción se ilustra la invención con referencia a ciertas realizaciones, esta no se limita a ellas. De hecho, varias modificaciones de la invención en adición a aquellas mostradas y descritas aquí serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la anterior descripción y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo (VEGF) de factor de crecimiento endotelial anti-vascular aislado en donde el anticuerpo comprende seis HVR seleccionados de:

(i) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de $X_1X_2R X_3SL$ en donde el HVR-L1 comprende 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: X_1 es G o A; X_2 es V o I; y/o X_3 es T o R;

(ii) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de DASSLA (SEQ ID NO:6);

(iii) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SYKSPL (SEQ ID NO:7);

(iv) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SISGSWIF (SEQ ID NO:1);

(v) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de GAIWPFGGYTH (SEQ ID NO:2).; y

(vi) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de RWGHSTSPWAMDY (SEQ ID NO:3).

2. Un anticuerpo anti-VEGF aislado, en donde el anticuerpo comprende:

(1) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:1 ;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:4;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

3. Un anticuerpo anti-VEGF aislado, en donde el anticuerpo comprende:

(1) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 5;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

4. Un anticuerpo anti-VEGF aislado, en donde el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o 45.

5. Un anticuerpo anti-VEGF aislado en donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o 45.

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44.

7. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:45.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo es humanizado.

10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo es humano.

11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde por lo menos una porción de la secuencia de estructura es una secuencia de estructura consensus humana.

12. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
13. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 12.
14. El vector de la reivindicación 13, en donde el vector es un vector de expresión.
15. Una célula anfitriona que comprende el vector de la reivindicación 13 o 14.
16. La célula anfitriona de la reivindicación 15, en donde la célula anfitriona es procariótica.
17. La célula anfitriona de la reivindicación 15, en donde la célula anfitriona es eucariótica.
18. La célula anfitriona de la reivindicación 15, en donde la célula anfitriona es de mamífero.
19. Un método para elaborar un anticuerpo anti-VEGF, dicho método comprende (a) expresar el vector de la reivindicación 14 en una célula de anfitriona adecuada, y (b) recuperar el anticuerpo.
20. Un método para elaborar un inmunoconjugado anti-VEGF, dicho método comprende (a) expresar el vector de la reivindicación 14 en una célula de anfitriona adecuada, y (b) recuperar el anticuerpo.
21. El método de la reivindicación 19 o 20, en donde la célula anfitriona es procariótica.
22. El método de la reivindicación 19 o 20, en donde la célula anfitriona es eucariótica.
23. Una composición que comprende el anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
24. Una composición que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14.
25. La composición de la reivindicación 23 o 24, en donde la composición comprende adicionalmente un portador.

26. Un método para la detección de VEGF, el método comprende detectar El complejo de anticuerpo VEGF-anti-VEGF en una muestra biológica en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 44 o 45.
27. El método de la reivindicación 26 en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44.
28. El método de la reivindicación 26 en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:45.
29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en donde el anticuerpo anti-VEGF se marca detectablemente.
30. Un método para tratar un tumor, cáncer, o trastorno proliferativo de célula que comprende administrar una cantidad efectiva del anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 a un sujeto en necesidad de tal tratamiento, por lo que se trata el tumor, cáncer o trastorno proliferativo de célula.
31. El método de la reivindicación 30, en donde el sujeto es humano.
32. El método de la reivindicación 30, en donde el tumor, cáncer, o trastorno proliferativo de célula es cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, o glioblastoma.
33. Un método para inhibir angiogenia en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
34. Un método para inhibir permeabilidad vascular que comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

FIGURAS

1 / 11

Clon #	H1							
	28	29	30	31	32	33	34	35
B20-4.1.1	S	I	S	G	S	W	I	F
B20-4.1.1RR	S	I	S	G	S	W	I	F

SEQ ID NO.: 1

Clon #	H2										
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
B20-4.1.1	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H
B20-4.1.1RR	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H

SEQ ID NO.: 2

Clon #	H3												
	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	101	102
B20-4.1.1	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y
B20-4.1.1RR	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y

SEQ ID NO.: 3

Clon #	L1					
	28	29	30	31	32	33
B20-4.1.1	G	V	R	T	S	L
B20-4.1.1RR	A	I	R	R	S	L

SEQ ID NO.: 4
SEQ ID NO.: 5

Clon #	L2					
	50	51	52	53	54	55
B20-4.1.1	D	A	S	S	L	A
B20-4.1.1RR	D	A	S	S	L	A

SEQ ID NO.: 6

Clon #	L3					
	91	92	93	94	95	96
B20-4.1.1	S	Y	K	S	P	L
B20-4.1.1RR	S	Y	K	S	P	L

SEQ ID NO.: 7

FIG. 1

I					
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-	
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
II					
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-	
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
III					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Aceptor					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Segundo Aceptor					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	

FIG. 2A

I			
A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-
B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-
C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCA	-H3-
D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYC	-H3-
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 8
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 9
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 10
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 11
II			
A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-
B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-
C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCA	-H3-
D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYC	-H3-
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 12
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 13
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 14
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 15
III			
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3-
D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 16
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 17
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 18
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 19
Aceptor			
A	RFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	-H3-
B	RFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	-H3-
C	RFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCS	-H3-
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 20
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 21
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 22
Segundo Aceptor			
A	RFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-
B	RFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-
C	RFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3-
D	RFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 23
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 24
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 25
		WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 26

FIG. 2B

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC[-L1-]WYQQKPGKAPKLLIY[-L2-]GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2 DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISC[-L1-]WYLQKPGQSPQLLIY[-L2-]GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC[-L1-]WYQQKPGQAPRLLIY[-L2-]GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC[-L1-]WYQQKPGQPPKLLIY[-L2-]GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

EDFATYYC[-L3-]FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 27
EDVGVIYC[-L3-]FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 28
EDFAVIYC[-L3-]FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 29
EDVAVIYC[-L3-]FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 30

FIG. 3

Secuencias de Estructura de huMAb4D5-8 de Cadena Pesada

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 31)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (SEQ ID NO: 32)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn^{82a} Ser^{82b} Leu^{82c} Arg⁸³ Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (SEQ ID NO: 33)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 34)

Secuencias de Estructura de huMAb4D5-8 de Cadena Ligera

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 35)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (SEQ ID NO: 36)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (SEQ ID NO: 37)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 38)

FIG. 4

Secuencias de Estructura de huMAb4D5-8 de Cadena Pesada Modificada en las Posiciones 71, 73 y 78 (subrayadas)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 31)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (SEQ ID NO: 32)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn^{82a} Ser^{82b} Leu^{82c} Arg⁸³ Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (SEQ ID NO: 42)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 34)

Secuencias de Estructura de huMAb4D5-8 de Cadena Ligera Modificada en la Posición 66 (subrayada)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 35)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (SEQ ID NO: 36)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (SEQ ID NO: 41)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 38)

FIG. 5

Kabat No.	CDR-L1						CDR-L2						CDR-L3					
	28	29	30	31	32	33	50	51	52	53	54	55	91	92	93	94	95	96
B20-4.1.1	G	V	R	T	S	L	D	A	S	S	L	A	S	Y	K	S	P	L
B20-4.1.1RR	A	I	R	R	S	L	D	A	S	S	L	A	S	Y	K	S	P	L

FIG. 6

Kabat No.	CDR-H1								CDR-H2										CDR-H3													
	28	29	30	31	32	33	34	35	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	101	102
B20-4.1.1	S	I	S	G	S	W	I	F	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y
B20-4.1.1RR	S	I	S	G	S	W	I	F	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y

FIG. 7

128

7111

131

129

8 / 11

132

37C	$k_{on}(x10^4)M^{-1}s^{-1}$		$k_{off}(x10^{-4})s^{-1}$		$Kd(k_{off} / k_{on})nM$	
IgG	hVEGF	mVEGF	hVEGF	mVEGF	hVEGF	mVEGF
B20.4.1	0.74	0.64	0.002	0.024	0.02	0.37
B20.4.1.1	7.1	5.59	5.94	5.66	8.34	10.13
B20.4.1.1RR	19.4	13.9	6.23	7.27	3.21	5.23

FIG. 10

37C	$k_{on}(x10^4)M^{-1}s^{-1}$		$k_{off}(x10^{-4})s^{-1}$		$Kd(k_{off} / k_{on})nM$	
IgG	hVEGF	mVEGF	hVEGF	mVEGF	hVEGF	mVEGF
B20.4.1	19.2	31.9	2.23	7.2	1.16	2.26
B20.4.1.1	57.1	33.1	9.68	7.91	1.70	2.39
B20.4.1.1RR	65.1	44.6	5.53	6.07	0.85	1.36

FIG. 11

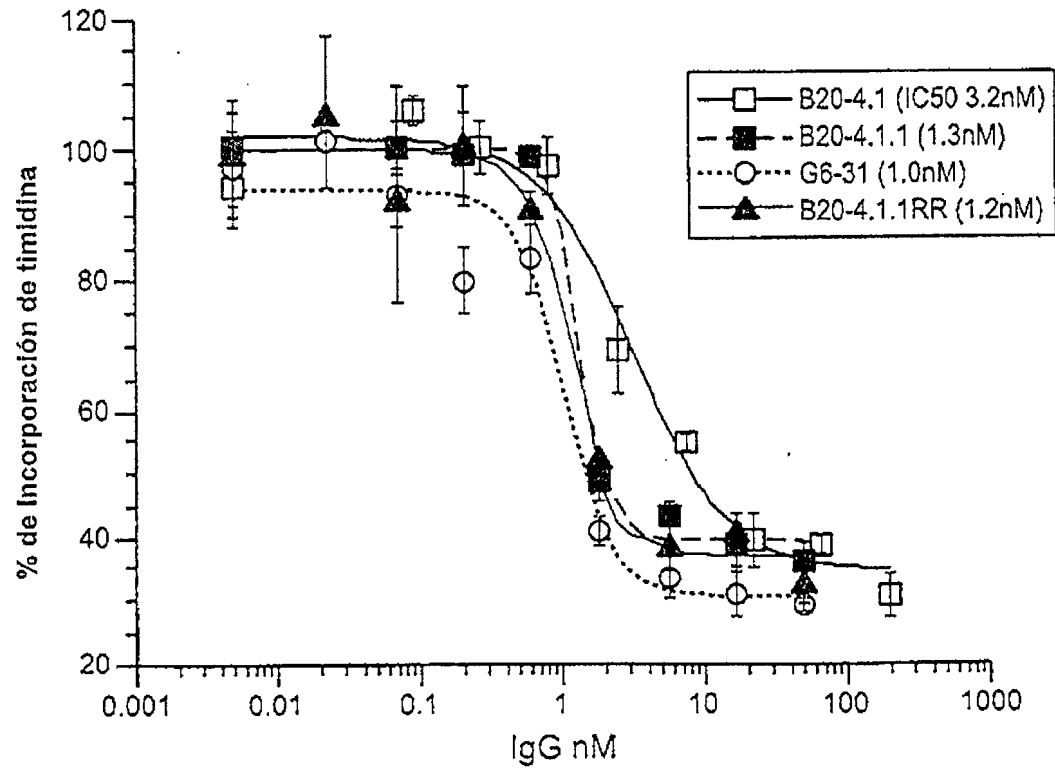


FIG. 12

10 / 11

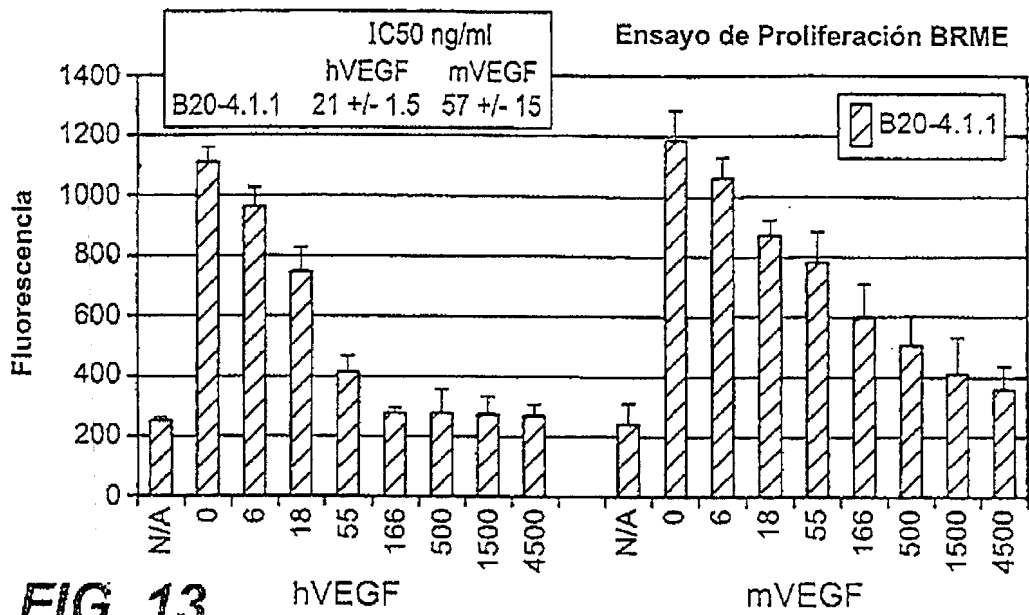


FIG. 13

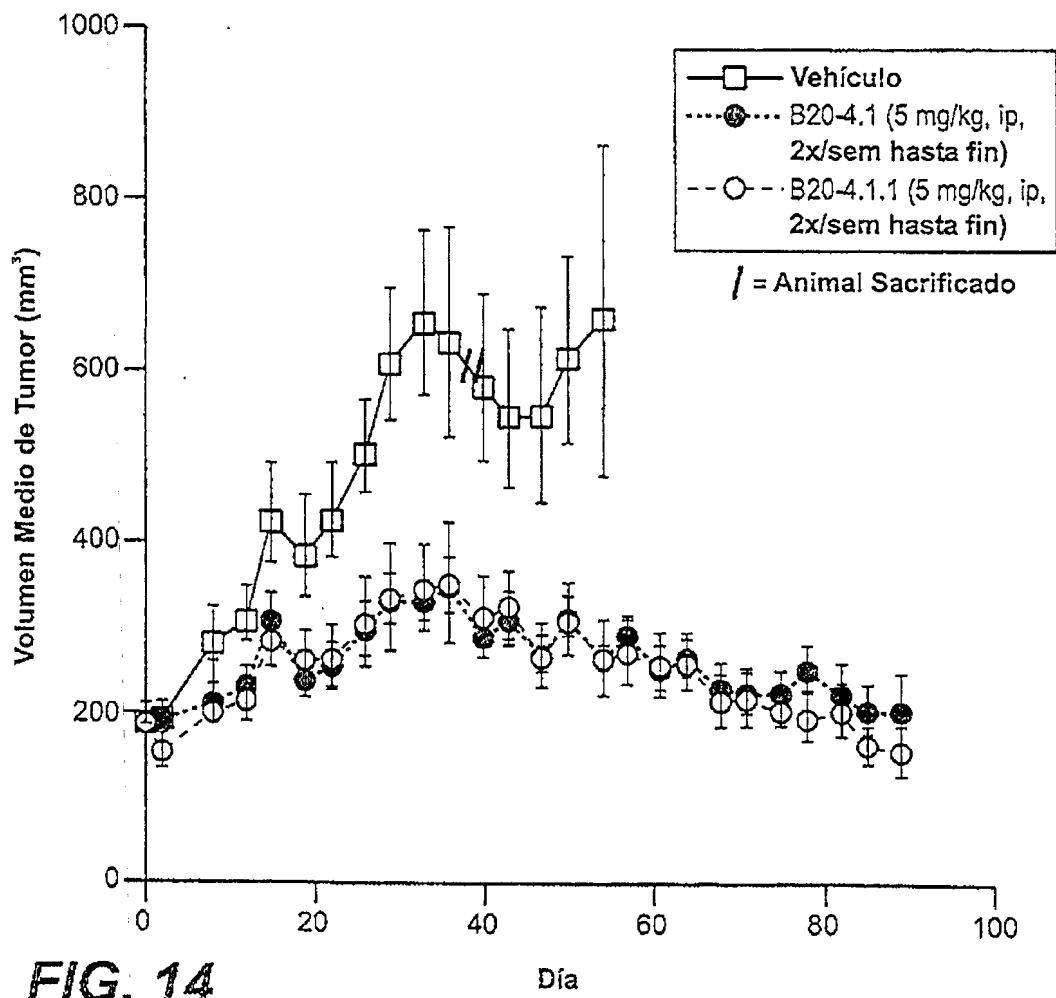


FIG. 14

11 / 11

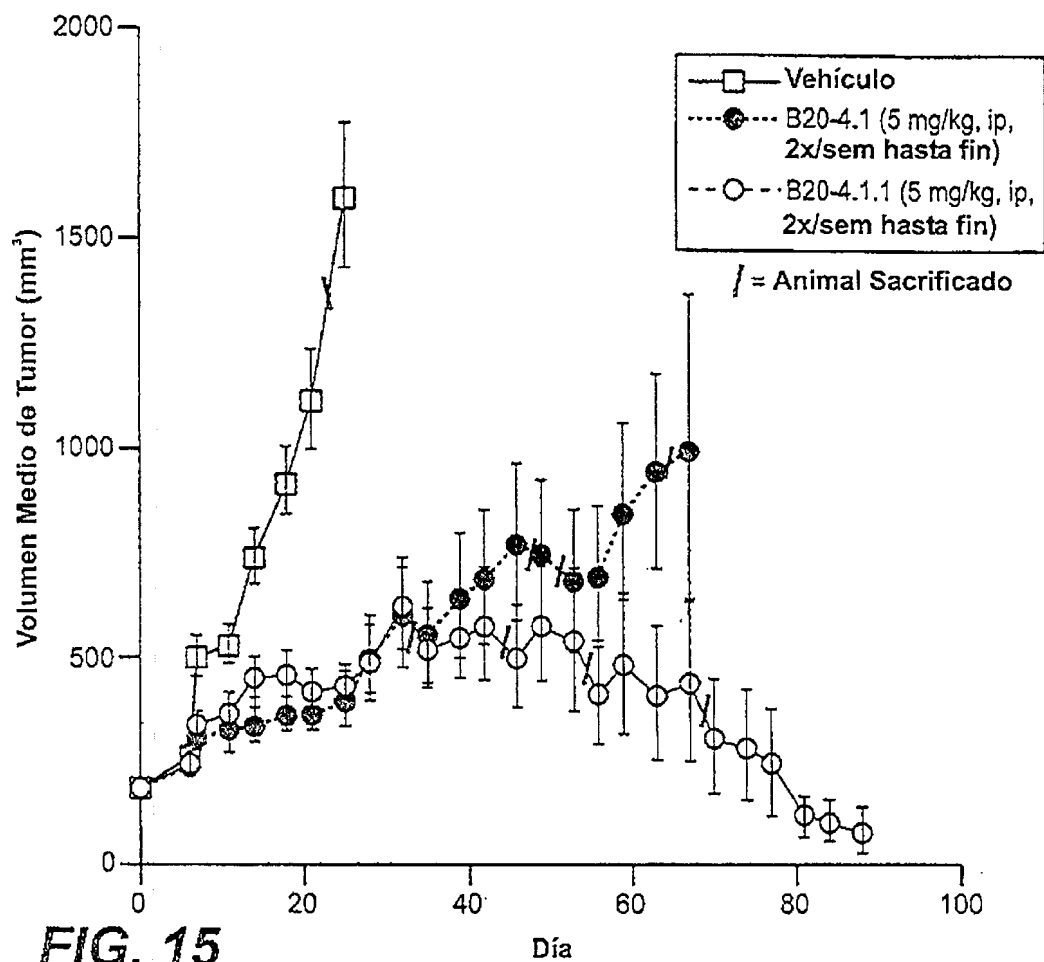
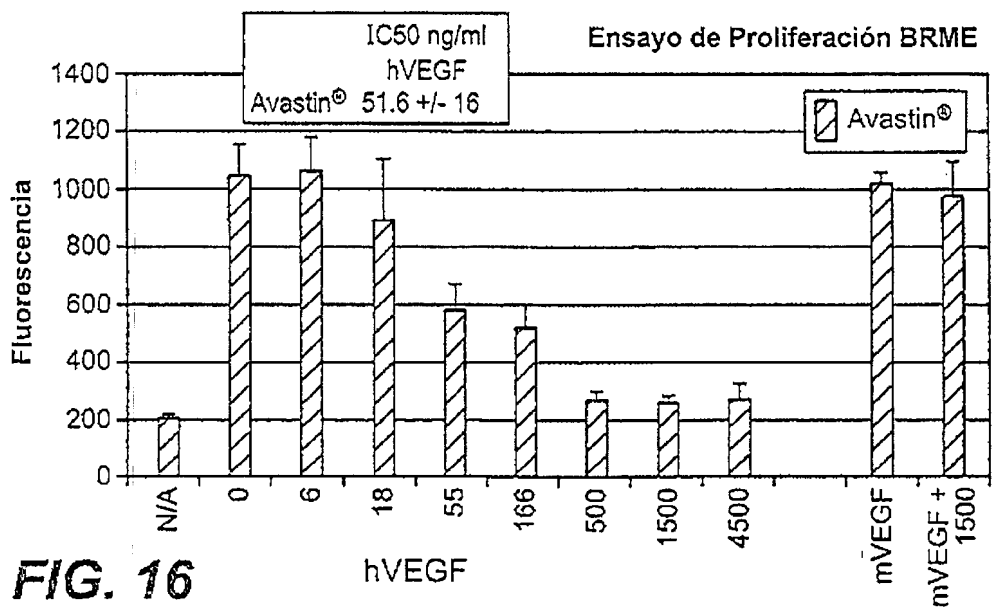


FIG. 16



LISTADO DE SECUENCIAS

Sequence Listing

<110> Genentech, Inc.
Fuh, Germaine
Lee, Chingwei V.

<120> Anti-VEGF Antibodies

<130> 50474/021w02

<150> 60/991,302
<151> 2007-11-30

<160> 45

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 1
Ser Ile Ser Gly Ser Trp Ile Phe
5

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 2
Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His
5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 3
Arg Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr
5 10

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 4
Gly Val Arg Thr Ser Leu
5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 5
Ala Ile Arg Arg Ser Leu
5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 6
Asp Ala Ser Ser Leu Ala
5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 7
Ser Tyr Lys Ser Pro Leu
5

<210> 8
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 8
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> 9
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 9
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> 10
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 10
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> 11
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 11
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> 12
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 12
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> 13
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 13
 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> 14
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 14
 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> 15
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 15
 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> 16
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 16
 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> 17
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 17
 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> 18
 <211> 80

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 18
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> 19
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 19
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> 20
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 20
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> 21
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 21
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> 22
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 22
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> 23
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 23
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 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

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 24
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> 25
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 25
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 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>
<223> sequence is synthesized

<400> 26
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> 27
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 27
 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 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> 28
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 28
 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> 29
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 29
 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
 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> 30
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 30
 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> 31
 <211> 25
 <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
 20 25

<210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 32
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 5 10

<210> 33
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> sequence is synthesized

 <400> 33
 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> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> sequence is synthesized

 <400> 34
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

 <210> 35
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> sequence is synthesized

 <400> 35
 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> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> sequence is synthesized

 <400> 36
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

 <210> 37
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> sequence is synthesized

 <400> 37
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg 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> 38
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 38
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 5 10

<210> 39
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 39
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg 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
 His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys

<210> 40
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

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

<210> 41
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 41
 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> 42
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 42
 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> 43
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 43
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Ser
 20 25 30
 Gly Ser Trp Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly His Ser Thr Ser Pro
 95 100 105
 Trp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 110 115 120
 Ser

<210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 44

```

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 Gly Val Arg
          20          25          30

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

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

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

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

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

Ile Lys Arg

```

<210> 45

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 45

```

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 Ala Ile Arg
          20          25          30

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

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

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

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

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

Ile Lys Arg

```

INDUSTRIA Y Comercio Dependencia		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido
Tipo de Radicación: Entrada ☐ Salida ☐ Traslado ☐ Convenio ☐				Planilla	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1			
2			
3	13-94381		
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Llave
4	Señal
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD ☒
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Reproducción en papel
15	USB
16	Otro

Observaciones:

FOUO ISO
ANEXO 1 CD

ANTICUERPOS ANTI-VEGF**RESUMEN**

La invención aquí proporciona anticuerpos aislados que unen al VEGF. La invención proporciona adicionalmente métodos para elaborar anticuerpos anti-VEGF, y polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-VEGF.

SML\SML\ID-239583WPC13563

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostilla para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

13563
9306

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
GENENTECH, INC.
domiciliado (s) en/of 1 DNA Way,
South San Francisco, California, 94080-4990, U.S.A.

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales,

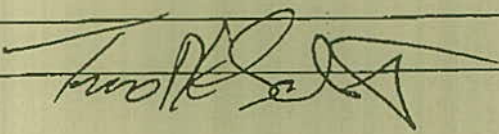
in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others alternates, in the order of their appointment, as our representatives in industrial property matters with faculty to receive notifications or appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, principal representative, or the first or second alternates in their turn, both of them, shall state their intention not to act as representative through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, representation can be taken again in their sequence, by the principal, first or second alternate depending on case, and the mere fact of exercise will suffice. The exercise of the representation by the second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above attorneys at law so that they may obtain the protection of my industrial property and against the unfair competition. For which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before authorities or persons, with or without jurisdiction, especially administrative, administrative contentious and judicial, as well as the Arbitration Court, in all matters concerning the following: Obtainment of patents, utility models and industrial designs; registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names,

enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the writ of amparo, the protection of trade secrets, and in general civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions instituted by me (us) or against me (us). And that in all the matters they may, substitute this Power of Attorney, compare, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 12th day of December, 2002
en/in South San Francisco, California
por/by _____

Firma  Signature

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

*Pls. see attached California
Notary all Purpose Acknowledgment*

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

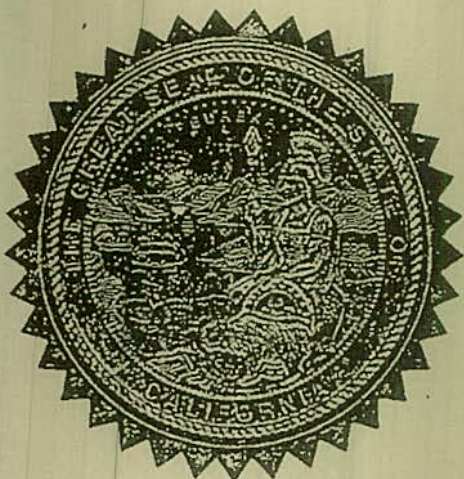
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by MARIA P. PEREZ
3. acting in the capacity of DEPUTY CLERK, County of SAN MATEO, State of California
4. bears the seal/stamp of the County of SAN MATEO, State of California

CERTIFIED

5. At San Francisco, California
6. The 20TH day of DECEMBER, 2002
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 49359
9. Seal/Stamp:

10. Signature



Bill Jones

BILL JONES
Secretary of State

BY _____

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN MATEO ss

I, WARREN SLOCUM, Assessor-County Clerk-Recorder, County of San Mateo, State of California, having by law a seal,

Do HEREBY CERTIFY, That TERI RENSHAW
Whose name is subscribed to the Certificate of Proof or acknowledgement of the annexed instrument and thereon written, was at the time of taking such proof or acknowledgement, a Notary Public in and for said County, residing therein, duly commissioned and sworn, and duly authorized by the laws of said state to administer oaths, take acknowledgements and proofs of deeds or conveyances for land, tenements or hereditaments in said State, to be recorded therein. And further that I am well acquainted with the handwriting of such Notary Public, and verily believe that the signature to said Certificate of Proof or acknowledgement is genuine, and that said instrument is executed and acknowledged according to the laws of said State. I further certify that an impression of the seals of Notaries Public is not required by law to be filed in my office.

FILED
STATE

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the

Assessor-County Clerk-Recorder, this 20 day of December 2002

WARREN SLOCUM Assessor-County Clerk-Recorder

By

Maria P. Perez

MARIA P. PEREZ

Deputy Clerk, County of San Mateo

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

SS.

On 12-12-2002 before me, Teri Renshaw, 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.

[Signature]
Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Colombia Pa

Document Date: 12-12-2002

Number of Pages: 4

Signer(s) Other Than Named Above: none

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: Timothy R. Schwartz, Ph.D.

Section Patent Counsel

Genentech, Inc.

Authorized Corporate Signatory

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

Signer Is Representing:

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 16 de Diciembre de 2002

~~Compañía~~ El suscrito
Timothy R. Schwartz

quien ~~es~~ firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía denominada GENENTECH, INC.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

ARTICULOS DE CONSTITUCION FECHADO JUNIO 1999
Y ESTATUTOS FECHADOS JUNIO 1999; CON SUS
RESPECTIVOS MODIFICACIONES.

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que GENENTECH, INC. es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Delaware.

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es 1 DNA Way, South San Francisco, California, 94080-4990, Estados Unidos de América

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Timothy R. Schwartz

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Ciudad Section Patent Counsel S. San Francisco
Genentech, Inc. California
Estado Authorized Corporate Signatory

Hoy 16 Diciembre de 2002

OFFICER

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 16th day of December 2002

~~appeared before me~~ The undersigned,

Timothy R. Schwartz,

~~who(m) I know personally and~~ who(m) signed this document, representative(s) of the Corporation/Company GENENTECH, INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents: Articles of Incorporation dated June 1999 Bylaws dated June 1999 ; both as amended from time to time.

2. That the above documents duly prove the following:

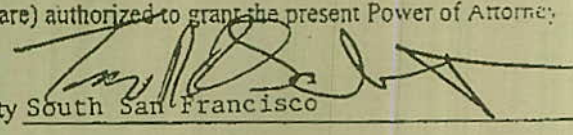
2.1. That GENENTECH, INC. is a Corporation/Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of the State of Delaware.

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is 1 DNA Way, South San Francisco, California, 94080-4990, United States of America.

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporate purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Timothy R. Schwartz

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

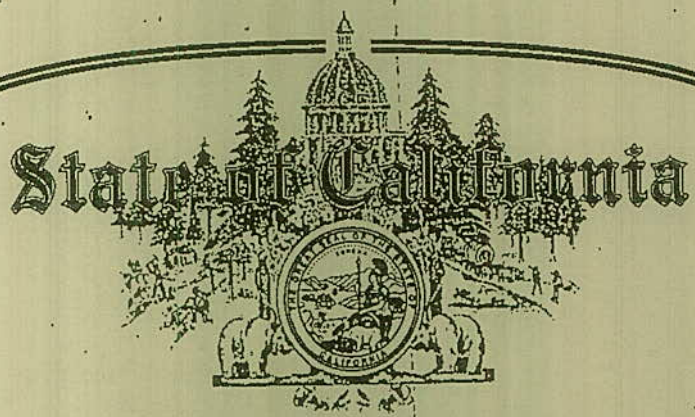

City South San Francisco

State California

This 16th day of December, 2002

~~Notario Público o Funcionario Autorizado~~ ~~Notary Public or Attesting Official~~

[ATTACH NOTARY ACKNOWLEDGEMENT]



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

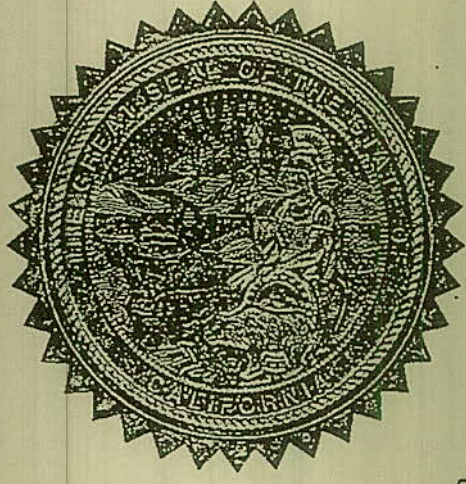
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by MARIA P. PEREZ
3. acting in the capacity of DEPUTY CLERK, County of SAN MATEO, State of California
4. bears the seal/stamp of the County of SAN MATEO, State of California

CERTIFIED

5. At San Francisco, California
6. The 20TH day of DECEMBER, 2002
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 49358
9. Seal/Stamp:

10. Signature



Bill Jones
BILL JONES
Secretary of State

BY _____



STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN MATEO ss

I, WARREN SLOCUM, Assessor-County Clerk-Recorder, County of San Mateo, State of California,
having by law a seal,

Do HEREBY CERTIFY, That TERI RENSHAW
Whose name is subscribed to the Certificate of Proof or acknowledgement of the annexed instrument
and thereon written, was at the time of taking such proof or acknowledgement, a Notary Public in and
for said County, residing therein, duly commissioned and sworn, and duly authorized by the laws of
said state to administer oaths, take acknowledgements and proofs of deeds or conveyances for land,
tenements or hereditaments in said State, to be recorded therein. And further that I am well acquainted
with the handwriting of such Notary Public, and verily believe that the signature to said Certificate of
Proof or acknowledgement is genuine, and that said instrument is executed and acknowledged
according to the laws of said State. I further certify that an impression of the seals of Notaries Public is
not required by law to be filed in my office.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the

Assessor-County Clerk-Recorder, this 20 day of December 2002

WARREN SLOCUM
WARREN SLOCUM, Assessor-County Clerk-Recorder
By Maria P. Perez **MARIA P. PEREZ**
Deputy Clerk, County of San Mateo

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

ss.

On 12-16-2002

before me,

Teri Renshaw, Notary Public

personally appeared

Timothy R. Schwartz

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

Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me

☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence



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

WITNESS my hand and official seal.

Teri Renshaw
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: Certificate of Officer

Document Date: 12-16-2002

Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: none

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s): _____

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney-in-Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER

Top of thumb here

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 10.01/03 realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Representación y Poder escrito en inglés y español por medio del cual GENENTECH, INC. domiciliado en el 1 DNA Way, South San Francisco, California, 94080-4990, Estados Unidos de América, otorga derechos de Representación y Poder a los Doctores EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555 y GERMÁN CAVELIER, tpa. 832.

Dado y firmado en 12 de diciembre de 2002

En South San Francisco, Claifornia

Por _____

Firma _____ Firma ilegible _____ Firma _____

Timothy R. Schwartz, Ph.D.

Sección Asesoría Legal en Patentes

Genentech, Inc.

Signatario Corporativo Autorizado

Por favor referirse al Certificado Notarial Multipropósito de California adjunto.

ACTA NOTARIAL DE RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITOS DE CALIFORNIA

Estado de California

SS.

Condado de San Mateo

El 12-12-2002 ante mí, Teri Renshaw, Notario Público

Nombre y Cargo del Funcionario (p.e. "Juan Pérez, Notario Público")

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS ?.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

compareció personalmente Timothy R. Schwartz

Nombre(s) del Firmante(s)

☒ a quien conozco personalmente

☐ probó ante mí con evidencia

satisfactoria ser la persona cuyo nombre
está suscrito en el documento y reconoció
ante mí que él ejecutó el mismo en su calidad
autorizada y que por medio de su firma
en el documento la persona o la entidad
a nombre de quien dicha persona actuó,
ejecutó el documento.

TERI RENSHAW
Comisión # 1272761
Notario Público - California
Condado de Santa Mateo
Comisión vence Agosto 3 de 2004
Sello circular al interior ilegible

TESTIFICA mi firma y sello oficial.

Firma Ilegible

Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la siguiente información no es obligatoria por ley, esta podría tener valor para aquellas personas que admitan el documento y podría prevenir la remoción fraudulenta y anexión de este formato a otro documento.

Descripción del Documento Anexo

Título o Tipo de Documento: Colombia Pod

Fecha del Documento: 12-12-2002 Número de Páginas: 4

Otros Firmante(s) distintos a los mencionados anteriormente: ninguno

Calidad(es) Pretendidas por el Firmante

Nombre del Firmante: _____

☐ Individuo

☐ Funcionario Corporativo Cargo(s): _____

☐ Socio-- ☐ Comanditario ☐ General

☐ Apoderado Timothy R. Schwartz, Ph. D.

☐ Fiduciario Sección de Asesoría Legal en Patentes

☐ Guardián o Curador Genentech, Inc.

Diego F. Varela
DIEGO F. VARELA Signatario Corporativo Autorizado

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

MIELA DEL FUGR
DERECHO DEL FIRMANTE
Ante del Fugr aquí

☐ Otro: _____

El firmante Representa a: _____

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN MATEO ss

Yo, WARREN SLOCUM, Registrador-Secretario de Condado-Asesor, del Condado de San Mateo, Estado de California, que tiene por ley un sello,

POR EL PRESENTE CERTIFICO, Que TERI RENSHAW

Cuyo nombre está suscrito en el Certificado de prueba o reconocimiento del anexo instrumento y en él suscrito, era al momento de tomar dicha prueba o reconocimiento, un Notario Público en y para dicho Condado, residente dentro del mismo, debidamente comisionado y juramentado, y debidamente autorizado por las leyes de dicho estado para administrar juramentos, tomar reconocimientos y pruebas de escrituras o transferencias de tierras, inmuebles o herencias en dicho Estado, a ser registrado en él. Y adicionalmente que estoy bien familiarizado con la escritura de dicho Notario Público y verdaderamente creo que la firma en dicho certificado de prueba o reconocimiento es auténtica, y que dicho instrumento está suscrito y reconocido de acuerdo a las leyes de dicho Estado. Adicionalmente certifico que la ley no requiere que se presente una impresión de los sellos de notario ante mí oficina.

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
 RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
 MINISTERIO DE JUSTICIA

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he suscrito y fijado
el sello de Registrador-Secretario de Condado-Asesor hoy 20 de
Diciembre de 2002

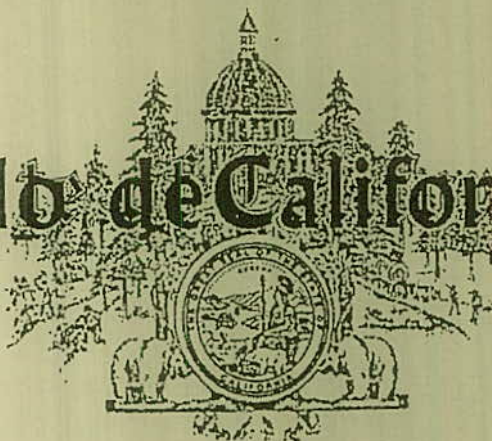
Firma Ilegible

WARREN SLOCUM; Registrador, Secretario de Condado-Asesor

Por: Firma Ilegible MARIA P. PEREZ

Suplente del Secretario, Condado de San Mateo

Estado de California



SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por MARIA P. PEREZ

3. actuando en calidad de SECRETARIO SUPLENTE, Condado de SAN MATEO, Estado de California

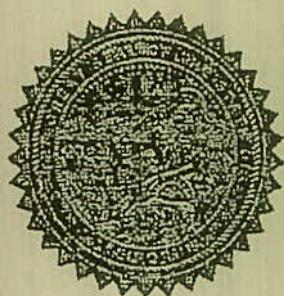
4. lleva el sello/estampilla del Condado de SAN MATEO,
Estado de California

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

165

CERTIFICADO

5. En San Francisco, California 6. El 20 de DICIEMBRE de 2002
7. por el Suplente del Secretario de Estado, Estado de California
8. No. 49359
9. Sello/estampilla:



10. Firma

Bill Jones

Bill Jones

Secretario de Estado.

Por Firma ilegible

Sello obtenido por escáner con inscripción: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA

Sellos parciales en tinta roja sobre los lados derechos de los dos documentos anteriores con la inscripción. EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.

CERTIFICADO DE UN FUNCIONARIO (SOCIEDAD) del 16 de diciembre de 2002 por medio del cual el suscrito Timothy R. Schwartz certifica que GENENTECH, INC. es una sociedad debidamente constituida y existente de acuerdo a las leyes de Delaware y que el domicilio de dicha compañía es 1 DNA Way, South San Francisco, California, 94080-4990, Estados Unidos de América. Adicionalmente certifica que el Señor Timothy R. Schwartz está autorizado para otorgar el presente Poder. Dado y firmado en South San Francisco, Estado de California hoy 16 de diciembre de 2003.

Firma Ilegible

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL

Timothy R. Schwartz, Ph.D. ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

00-2202

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2003 JAN 14 A 11:36

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

166

Sección Asesoría Legal en Patentes
Genentech, Inc.
Signatario Corporativo Autorizado

ACTA NOTARIAL DE RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITOS DE CALIFORNIA

Estado de California

SS.

Condado de San Mateo

El 12-16-2002 ante mí, Teri Renshaw, Notario Público

Nombre y Cargo del Funcionario (p.e. "Juan Pérez, Notario Público")

compareció personalmente Timothy R. Schwartz

Nombre(s) del Firmante(s)

☒ a quien conozco personalmente

☐ probó ante mí con evidencia

satisfactoria ser la persona cuyo nombre

está suscrito en el documento y reconoció

ante mí que él ejecutó el mismo en su calidad

autorizada y que por medio de su firma

en el documento la persona o la entidad

a nombre de quien dicha persona actuó,

ejecutó el documento.

TERI RENSHAW
Comisión # 1272761
Notario Público - California
Condado de Santa Mateo
Comisión vence Agosto 3 de 2004
Sello circular al interior ilegible

TESTIFICA mí firma y sello oficial.

Firma Ilegible

Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la siguiente información no es obligatoria por ley, esta podría tener valor para aquellas personas que admitan el documento y podría prevenir la remoción fraudulenta y anexión de este formato a otro documento.

Descripción del Documento Anexo

Título o Tipo de Documento: Funcionario Certificado

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

167

Fecha del Documento: 12-16-2002 Número de Páginas: 1

Otros Firmante(s) distintos a los mencionados anteriormente: ninguno

Calidad(es) Pretendidas por el Firmante

Nombre del Firmante: _____

☐ Individuo

☐ Funcionario Corporativo Cargo(s): _____

☐ Socio-- ☐ Comanditario ☐ General

☐ Apoderado

☐ Fiduciario

☐ Guardián o Curador

☐ Otro: _____

El firmante Representa a: _____

HELA DEL PULGR
DEPCHO DEL FIRMANTE
Punta del Pulgar Aquí

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN MATEO ss

Yo, WARREN SLOCUM, Registrador-Secretario de Condado-Asesor, del Condado de San Mateo, Estado de California, que tiene por ley un sello,

POR EL PRESENTE CERTIFICO, Que TERI RENSCHAW

Cuyo nombre está suscrito en el Certificado de prueba o reconocimiento del anexo instrumento y en él suscrito, era al momento de tomar dicha prueba o reconocimiento, un Notario Público en y para dicho Condado, residente dentro del mismo, debidamente comisionado y juramentado, y debidamente autorizado por las leyes de dicho estado para administrar juramentos, tomar reconocimientos y

DIEGO F. VARGAS
Digo F. Varga
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

160

pruebas de escrituras o transferencias de tierras, inmuebles o herencias en dicho Estado, a ser registrado en él. Y adicionalmente que estoy bien familiarizado con la escritura de dicho Notario Público y verdaderamente creo que la firma en dicho certificado de prueba o reconocimiento es auténtica, y que dicho instrumento está suscrito y reconocido de acuerdo a las leyes de dicho Estado. Adicionalmente certifico que la ley no requiere que se presente una impresión de los sellos de notario ante mí oficina.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he suscrito y fijado el sello de Registrador-Secretario de Condado-Asesor hoy 20 de Diciembre de 2002

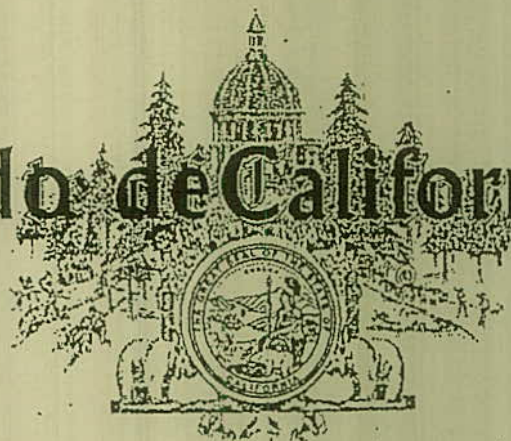
Firma Ilegible

WARREN SLOCUM, Registrador, Secretario de Condado-Asesor

Por: *Firma Ilegible* MARIA P. PEREZ

Suplente del Secretario, Condado de San Mateo

Estado de California



SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961) **TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL**
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por MARIA P. PEREZ
3. actuando en calidad de SECRETARIO SUPLENTE, Condado de SAN MATEO, Estado de California
4. lleva el sello/estampilla del Condado de SAN MATEO, Estado de California

CERTIFICADO

5. En San Francisco, California
6. El 20 de DICIEMBRE de 2002
7. por el Suplente del Secretario de Estado, Estado de California
8. No. 49358
9. Sello/estampilla:

10. Firma



Bill Jones
Bill Jones
Secretario de Estado

Por Firma ilegible

Sello obtenido por escáner con inscripción: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.
Sellos parciales en tinta roja sobre los lados derechos de los dos documentos anteriores con la inscripción. EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ/ID-4082/WPCL002G/COLO 13563-701-001-2

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Dica. P. Viveros

002201

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2003 JAN 14 A 11:36

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR-
MA(S) PUESTA(S) POR *Diego Varg*
IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s) _____
ES(SON) AUTENTICA(S)
SANTAFE DE BOGOTA, 14 JAN 2003



770

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : GENENTECH, INC.

Poder conferido el : 12/12/2002

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C.

Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,

NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE

BOGOTÁ, D.C.

Comercio (en)

204 NOV 2009

Quintero Amparo (en) (a) C.C.

138019 319 79

31716344 79 23114

Y declaró (aron) que le (s) firma (s), que apraco (n)

en el presente documento es (son) la (s) suya (s) y

que el contenido del mismo es cierto.

En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Fuen
Luz Clemencia Bobber



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



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0032906

Bogotá D.C., Abril 09 de 2013 - 16:12:08

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196871872	09/04/2013	11.680.000.00

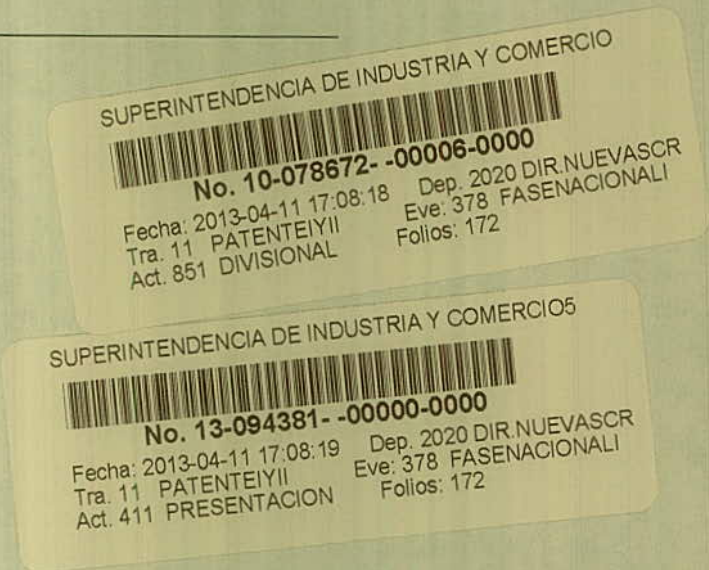
*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
			\$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____



colo: 13563-841-003-9

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



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0034046

Bogotá D.C., Abril 11 de 2013 - 10:55:46

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	30574	03/04/2013		325.000.00
RECIBO DE CA	999999999	30613	03/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	32874	09/04/2013		15.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
29 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	870.000.00
			\$870.000.00

SON: **OCHOCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-078672- -00006-0000

Fecha: 2013-04-11 17:08:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 172

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-094381- -00000-0000

Fecha: 2013-04-11 17:08:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 172

Colo: 13563-841-003-9

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

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

Abril 11 de 2013 - 10:55:47