SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7

No. 14-070836- -00000-0000

Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y CO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-144908- -00008-0000

Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TITULO** ANTICUERPOS ANTI-FGFR2 HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** GENENTECH INC

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO CA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO SALEM SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.**

(FORMA P 10)

Oficina de Comunicaciones

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7 vo de radicación

No. 14-070836- -00000-0000
Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-144908- -00008-0000
Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

AS. 127.721

DIRECCIÓN
CONVERSIÓN, DIV...

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ☒ **División** ☐ **Fusión**

☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

GENENTECH, INC.
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☒

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número_____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	1 DNA Way, CA 94080	South San Francisco

Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

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

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO	80.410.337	57492

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

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

2

4. Datos del trámite

CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 11.144.908	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

5. Anexos

Comprobante de pago No. 14-8085, 14-7807 14-10278 Fecha: 24 enero 2014 (2) 29 enero 2014 (1)

6. Anexos

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

7. Firma

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

127721 3

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 008085

Bogotá D.C., Enero 24 de 2014 - 11:39:05

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

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	7856	24/01/2014		1.896.000.00
RECIBO DE CA	999999999	8077	24/01/2014		1.856.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
				$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable _____
-*-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 14-070836- -00000-0000
Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-144908- -00008-0000
Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

127721 4

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 007807

Bogotá D.C., Enero 24 de 2014 - 08:09:18

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

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	650548426	23/01/2014	76.153.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO
9	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	279.000.00
				$279.000.00

SON: **DOSCIENTOS SETENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-**-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 14-070836- -00000-0000
Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-144908- -00008-0000
Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

127721

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0010278

Bogotá D.C., Enero 29 de 2014 - 16:30:20

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

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	650529541	29/01/2014	27.663.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
36	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	1.116.000.00
				$1.116.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N CIENTO DIECISEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-********-
Recibo de Caja Aplicado al.Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-144908- -00008-0000
Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 14-070836- -00000-0000
Fecha: 2014-04-02 16:54:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

REIVINDICACIONES 4F11.v22

1. Un anticuerpo anti-EGFL7 que comprende un dominio variable que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de región hipervariable (HVR) seleccionadas del grupo que consta de:

(i) HVR-L1 que comprende $KX_1SX_2SX_3DYX_4GDSYX_5S$, en donde X_1 es A o R; X_2 es H o Q; X_3 es G o V; X_4 se selecciona del grupo que consta de D, L, R, S, y W; y X_5 es M o V (SEQ ID Nº: 210);

(ii) HVR-L2 que comprende $GASX_1X_2EX_3$, en donde X_1 es N o Y; X_2 se selecciona del grupo que consta de L, R y Y; y X_3 es Q o S (SEQ ID Nº: 211);

(iii) HVR-L3 que comprende $QQNNEX_1PX_2T$, en donde X_1 es D o E; y X_2 es F o Y (SEQ ID Nº: 212);

(iv) HVR-H1 que comprende $GX_1X_2X_3X_4TYGX_5S$, en donde X_1 es H o V; X_2 es R o T; X_3 se selecciona del grupo que consta de F, G, R, y S; X_4 se selecciona el grupo que consta de D, G, R, y T; y X_5 es M o Y (SEQ ID Nº: 213);

(v) HVR-H2 que comprende $GWINX_1X_2SGVPTX_3AX_4X_5X_6X_7X_8$, en donde X_1 se selecciona del grupo que consta de I, M, T, y W; X_2 es H o R; X_3 se selecciona del grupo que consta de I, M, T, y Y; X_4 es D o H; X_5 se selecciona del grupo que consta de D, M y T; X_6 es F o Y; X_7 es K o S; y X_8 es G o R (SEQ ID Nº: 214, y

(vi) HVR-H3 que comprende $AX_1LGSX_2AVDX_3$, en donde X_1 es N o R; X_2 se selecciona del grupo que consta de C, S, y Y; y X_3 es A o Y (SEQ ID Nº: 215).

2. El anticuerpo anti-EGFL7 de la reivindicación 1 que comprende un dominio variable que comprende las siguientes secuencias de HVR:

(i) HVR-L1 que comprende $KX_1SX_2SX_3DYX_4GDSYX_5S$, en donde X_1 es A o R; X_2 es H o Q; X_3 es G o V; X_4 se selecciona del grupo que consta de D, L, R, S, y W; y X_5 es M o V (SEQ ID Nº: 210);

(ii) HVR-L2 que comprende $GASX_1X_2EX_3$, en donde X_1 es N o Y; X_2 se selecciona del grupo que consta de L, R y Y; y X_3 es Q o S (SEQ ID Nº: 211);

(iii) HVR-L3 que comprende $QQNNEX_1PX_2T$, en donde X_1 es D o E; y X_2 es F o Y (SEQ ID Nº: 212);

(iv) HVR-H1 que comprende $GX_1X_2X_3X_4TYGX_5S$, en donde X_1 es H o V; X_2 es R o T; X_3 se selecciona del grupo que consta de F, G, R, y S; X_4 se selecciona el grupo que consta de D, G, R, y T; y X_5 es M o Y (SEQ ID Nº: 213);

(v) HVR-H2 que comprende $GWINX_1X_2SGVPTX_3AX_4X_5X_6X_7X_8$, en donde X_1 se selecciona del grupo que consta de I, M, T, y W; X_2 es H o R; X_3 se selecciona del grupo

que consta de I, M, T, y Y; X_4 es D o H; X_5 se selecciona del grupo que consta de D, M y T; X_6 es F o Y; X_7 es K o S; y X_8 es G o R (SEQ ID Nº: 214), y

(vi) HVR-H3 que comprende $AX_1LGSX_2AVDX_3$, en donde X_1 es N o R; X_2 se selecciona del grupo que consta de C, S, y Y; y X_3 es A o Y (SEQ ID Nº: 215).

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 en donde HVR-L1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nº: 31 y 37-43, HVR-L2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nº: 32 y 44-47, HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nº: 33 y 48, HVR-H1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nº: 34 y 49-57, HVR-H2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nº: 35 y 58-73, y HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nº: 36 y 74-77.

4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–3, en donde la cadena pesada comprende las siguientes secuencias marco: FR-H1 comprende $EX_1QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS$, en donde X_1 es I o V (SEQ ID Nº: 216); FR-H2 comprende $WVRQAPGKGLEWX_1$, en donde X_1 es I o V (SEQ ID Nº: 217); FR-H3 comprende $RFTX_1SX_2DX_3SX_4X_5TX_6YLQMNSLRAEDTAVYX_7CAR$, en donde X_1 es F o I; X_2 es L o R; X_3 es N o T, X_4 se selecciona del grupo que consta de A, E, K y T; X_5 es N o S; X_6 se selecciona del grupo que consta de A, L, M, T y V; y X_7 es F o Y (SEQ ID Nº: 218); y FR-H4 comprende WGQGTLVTVSS (SEQ ID Nº: 219).

5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde la cadena pesada comprende las siguientes secuencias marco: FR-H1 comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID Nº: 197); FR-H2 comprende WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID Nº: 198); FR-H3 comprende $RFTISX_1DNSKNTX_2YLQMNSLRAEDTAVYYCAR$, en donde X_1 L o R; X_2 se selecciona del grupo que consta de A, L, M, T y V (SEQ ID Nº: 220); y FR-H4 comprende WGQGTLVTVSS (SEQ ID Nº: 200).

6. El anticuerpo de la reivindicación 4 o 5, en donde la cadena liviana comprende las siguientes secuencias marco: FR-L1 comprende DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID Nº: 201); FR-L2 comprende WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID Nº: 202); FR-L3 comprende

GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID Nº: 203); FR-L4 comprende FGQGTKVEIK (SEQ ID Nº: 221) o FGQGTKVEIKR (SEQ ID Nº: 204).

7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la cadena liviana comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v22 como se muestra en la Figura 15 (SEQ ID Nº: 83).

8. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v22 como se muestra en la Figura 16 (SEQ ID Nº: 85).

9. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la cadena liviana comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v22 como se muestra en la Figura 15 (SEQ ID Nº: 83) y la cadena pesada comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v22 como se muestra en la Figura 16 (SEQ ID Nº: 85).

10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos una porción de la secuencia marco es una secuencia marco consenso humana.

11. El anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende la secuencia marco consenso del subgrupo 1 K humana.

12. El anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende la secuencia marco consenso del subgrupo III humana de cadena pesada.

13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicho anticuerpo en un anticuerpo biespecífico.

14. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 13, en donde dicho anticuerpo biespecífico se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

15. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 14, donde dicho anticuerpo biespecífico se une al mismo epítopo de VEGF como bevacizumab o ranibizumab.

16. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

17. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 16.

18. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 16 o el vector de la reivindicación 17.

19. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

20. La composición de la reivindicación 19, en donde la composición comprende un portador.

21. La composición de la reivindicación 19 o 20, la cual es una composición farmacéutica.

22. Un método para preparar un anticuerpo anti-EGFL7, dicho método que comprende (a) expresar un vector de la reivindicación 17 en una célula huésped adecuada, y (b) recuperar el anticuerpo.

23. El método de la reivindicación 22, en donde la célula huésped es procariota.

24. El método de la reivindicación 22, en donde la célula huésped es eucariota.

25. Un método para tratar un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular, el método comprende la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-EGFL7 de cualquiera de las reivindicaciones 1–15 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

26. El método de la reivindicación 25, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consta de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y carcinoma hepatocelular.

27. El método de la reivindicación 26, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal o cáncer de pulmón.

28. El método de la reivindicación 25, en donde el trastorno proliferativo celular es cáncer.

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 25–28, que además comprende la administración a un individuo de una cantidad efectiva de un segundo medicamento, en donde el anticuerpo anti-EGFL7 es un primer medicamento.

30. El método de la reivindicación 29, en donde el segundo medicamento es otro anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente anti-angiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citosina, un antagonista de citosina, radioterapia citotóxica, un corticosteroide, un antiemético, una vacuna contra el cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento.

31. El método de la reivindicación 30, en donde el segundo medicamento en un anticuerpo anti-VEGF.

32. El método de la reivindicación 31, en donde el segundo medicamento es bevacizumab.

33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 29–32, en donde el segundo medicamento se administra con anterioridad o posterioridad a la administración del anticuerpo anti-EGFL7.

34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 29–32, en donde el segundo medicamento se administra en forma concurrente con el anticuerpo anti-EGFL7.

35. Un método de reducción o inhibición de la angiogénesis en un sujeto que padece una afección patológica asociada con angiogénesis, que comprende la administración a un sujeto de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–15, por lo tanto, se reduce o se inhibe la angiogénesis en un sujeto.

36. El método de la reivindicación 35, en donde dicha afección patológica es una afección neoplásica.

37. El método de la reivindicación 35, en donde dicha afección patológica es una afección no neoplásica.

38. El método de la reivindicación 37, en donde dicha afección no neoplásica se selecciona del grupo que consta de retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas, retinopatía de premadurez, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de córnea, neovascularización de injerto de córnea, neovascularización retinal/ coroidal.

39. Un método de mejoramiento de la eficacia de un agente anti-angiogénesis en sujeto que padece una afección patológica asociada con la angiogénsis, que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–15 en combinación con el agente anti-angiogénsis, por lo tanto se mejora la actividad inhibidora del agente de anti-angiogénesis.

40. El método de la reivindicación 39, en donde la afección patológica asociada con la angiogénesis es un tumor, cáncer o trastorno proliferativo celular.

41. El método de la reivindicación 39, en donde dicha afección patológica asociada con angiogénesis es una afección no neoplásica.

42. El método de la reivindicación 41, en donde dicha afección no neoplásica se selecciona del grupo que consta de retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas, retinopatía de premadurez, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de córnea, neovascularización de injerto de córnea, neovascularización retinal/ coroidal.

43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 39–42, en donde dicho agente anti-angiogénesis se administra con anterioridad o posterioridad a la administración del anticuerpo anti-EGFL7.

44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 39–42, en donde dicho agente anti-angiogénesis se administra en forma concurrente con el anticuerpo anti-EGFL7.

45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 39–42, en donde dicho agente anti-angiogénesis es un agente anti-VEGF.

46. El método de la reivindicación 45, en done dicho agente anti-VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

47. El método de la reivindicación 46, en donde dicho anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

48. El método de la reivindicación 46, en donde dicho anticuerpo anti-VEGF es ranibizumab.

49. Un método de reducción o inhibición de perfusión y permeabilidad de un tumor en un sujeto, que comprende la administración al sujeto un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–15, por lo tanto reduce o inhibe la perfusión y permeabilidad de un tumor en un sujeto.

50. El método de la reivindicación 49, además comprende la administración de un agente anti-angiogénesis.

51. El método de la reivindicación 50, en donde dicho agente anti-angiogénesis se administra con anterioridad o posterioridad a la administración del anticuerpo anti-EGFL7.

52. El método de la reivindicación 50, en donde dicho agente anti-angiogénesis se administra en forma concurrente con el anticuerpo anti-EGFL7.

53. El método de cualquiera de las reivindicaciones 49–52, en donde dicho agente anti-angiogénesis es un agente anti-VEGF.

54. El método de la reivindicación 53, en donde dicho agente anti-VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

55. El método de la reivindicación 54, en donde dicho anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: ____/ ____/ ____/ AAAA MM DD	Recorrido:
2020	2014 4 2	4

Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-70836-	0	7
2	11-144908-	8	7
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	***Soporte Documental***
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 4 ARCHIVOS:

4 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS.

EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO 14

118459
06 Dec 12

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by T. Lawrence

3. acting in the capacity of Certifying Officer

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

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the eighteenth of October, 2011

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

8. No. 12001865-7

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson

A 7319694

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

October 06, 2011

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON MAY 21, 2010.

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

T. Lawrence

T. LAWRENCE
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

ic Version v1.1
eet Version v1.1

ISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
RE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

VEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
ilan Ye	05/05/2010
rk Dennis	05/03/2010
Fredrickson	05/05/2010

CEIVING PARTY DATA

lame:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
nternal Address:	MS-49
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	12776259

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650 467-2607
Email: pgolden@gene.com
Correspondent Name: Grant Kalinowski
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: MS-49
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	P4328R1
NAME OF SUBMITTER:	Grant Kalinowski

Total Attachments: 6

CH $40.00 12776259

501183514

P4328R1USAssignment#page1.tif
P4328R1USAssignment#page2.tif
P4328R1USAssignment#page3.tif
P4328R1USAssignment#page4.tif
P4328R1USAssignment#page5.tif
P4328R1USAssignment#page6.tif

ASSIGNMENT

HEREAS, Weilan Ye, a citizen of US, residing at 119 Barkentine Street, Foster City, CA 94404, and Mark Dennis, citizen of US, residing at 120 Plymouth Avenue, San Carlos, CA 94070, and Jill Fredrickson, a citizen of US, siding at 786 Allison Way, Sunnyvale, CA 94087 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful vention in

HUMANIZED ANTI-EGFL7 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

or which a provisional application Serial No. 61/176,817 (Docket No. PR4328) has been filed on 8 May 2009; and for which non-provisional application Serial No.12/776,259[1] (Docket No. P4328R1 US) for Letters Patent has been filed by them on 7 May 2010[1]; and International Application No. PCT/US2010/34097 (Docket No. P4328R1 WO) has been filed by them on 7 May 2010[1];

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

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

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

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

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

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

[1]Assignors hereby authorize Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application numbers and filing date information when they become known.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: 5/5/2010

Weilan Ye

South San Francisco

Dated: _____

Mark Dennis

South San Francisco

Dated: _____

Jill Fredrickson

ASSIGNMENT

WHEREAS, Weilan Ye, a citizen of US, residing at 119 Barkentine Street, Foster City, CA 94404, and Mark Dennis, a citizen of US, residing at 120 Plymouth Avenue, San Carlos, CA 94070, and Jill Fredrickson, a citizen of US, residing at 786 Allison Way, Sunnyvale, CA 94087 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

HUMANIZED ANTI-EGFL7 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

for which a provisional application Serial No. 61/176,817 (Docket No. PR4328) has been filed on 8 May 2009; and for which non-provisional application Serial No.12/776,259[1] (Docket No. P4328R1 US) for Letters Patent has been filed by them on 7 May 2010[1]; and International Application No. PCT/US2010/34097 (Docket No. P4328R1 WO) has been filed by them on 7 May 2010[1];

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

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

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

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

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

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

[1]Assignors hereby authorize Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application numbers and filing date information when they become known.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

_____
Weilan Ye

South San Francisco

Dated: 5-3-10

_____
Mark Dennis

South San Francisco

Dated: _____

_____
Jill Fredrickson

ASSIGNMENT

WHEREAS, Weilan Ye, a citizen of US, residing at 119 Barkentine Street, Foster City, CA 94404, and Mark Dennis, citizen of US, residing at 120 Plymouth Avenue, San Carlos, CA 94070, and Jill Fredrickson, a citizen of US, residing at 786 Allison Way, Sunnyvale, CA 94087 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

HUMANIZED ANTI-EGFL7 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

for which a provisional application Serial No. 61/176,817 (Docket No. PR4328) has been filed on 8 May 2009; and for which non-provisional application Serial No.12/776,259[1] (Docket No. P4328R1 US) for Letters Patent has been filed by them on 7 May 2010[1]; and International Application No. PCT/US2010/34097 (Docket No. P4328R1 WO) has been filed by them on 7 May 2010[1];

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

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

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

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

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

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

[1]Assignors hereby authorize Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application numbers and filing date information when they become known.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

_____
Weilen Ye

South San Francisco

Dated: _____

_____
Mark Dennis

South San Francisco

Dated: May 5, 2010

_____
Jill Fredrickson

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A **GENENTECH, INC** firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público
2. ha sido firmado por T. LAWRENCE
3. actuando en capacidad de FUNCIONARIO QUE CERTIFICA
4. lleva el sello/timbre de la OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el dieciocho de octubre de 2011
7. por el Funcionario de Autenticación Asistente, Departamento de Estado de los Estados Unidos.
8. No. 12001865-7
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Sonya N. Johnson

[Sello]

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

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

06 de octubre de 2011

LA PRESENTE CERTIFICA QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA TOMADA DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO ARCHIVADO EL 21 DE MAYO DE 2010.

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

(Firma)
T. LAWRENCE
Funcionario que certifica

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

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de ejecución
Weilan Ye	05/05/2010
Mark Dennis	05/03/2010
Jill Fredrickson	05/05/2010

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Dirección interna:	MS-49
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080

NÚMERO DE PROPIEDADES Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	12776259

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (650) 952 9881

La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Teléfono: 650 467 2607

Correo electrónico: pgolden@gene.com

Nombre del destinatario: Grant Kalinowski

Dirección Línea 1: Genentech, Inc.

Dirección Línea 2: MS-49

Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	P4328R1
NOMBRE DEL REMITENTE:	Grant Kalinowski

Total anexos: 6

PATENTE

501183514

ROLLO: 024422 CUADRO: 0744

Fuente= P4328R1USAssignment#page1.tif
Fuente= P4328R1USAssignment#page2.tif
Fuente= P4328R1USAssignment#page3.tif
Fuente= P4328R1USAssignment#page4.tif
Fuente= P4328R1USAssignment#page5.tif
Fuente= P4328R1USAssignment#page6.tif

Expediente de Abogado No. P4328R1

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Weilan Ye**, un ciudadano de Estados Unidos, residente en 119 Barkentine Street, Foster City, CA 94404; y **Mark Dennis**, un ciudadano de Estados Unidos, residente 786 Allison Way, Sunnyvale, CA 94087 (en adelante denominados como "CEDENTES"), han inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPOS ANTI-EGFL7 HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/176,817 (Expediente No. PR4328) el 08 de mayo de 2009; y para la cual se presentó por parte de ellos una solicitud no provisional con Serial No. 12/776,259 (Expediente No. P4328R1 US) para Título de Patentes el 07 de mayo de 2010; y una solicitud internacional No. PCT/US2010/034097 (Expediente No. P4328R1 WO) el 07 de mayo de 2010[1];

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

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

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

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

PATENTE

ROLLO: 024422 CUADRO: 0746

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

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

[1] Los Cedentes por la presente autorizan a Genentech, Inc., y sus representantes y cesionarios ingresar los números de solicitudes y fecha de presentación cuando se conozcan.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

05/05/2010
Fecha

(firma)
Nombre: WEILAN YE

South San Francisco

Fecha

Nombre: MARK DENNIS

South San Francisco

Fecha

Nombre: JILL FREDRICKSON

PATENTE

ROLLO: 024422 CUADRO: 0747

Expediente de Abogado No. P4328R1

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Weilan Ye**, un ciudadano de Estados Unidos, residente en 119 Barkentine Street, Foster City, CA 94404; y **Mark Dennis**, un ciudadano de Estados Unidos, residente 786 Allison Way, Sunnyvale, CA 94087 (en adelante denominados como "CEDENTES"), han inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPOS ANTI-EGFL7 HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/176,817 (Expediente No. PR4328) el 08 de mayo de 2009; y para la cual se presentó por parte de ellos una solicitud no provisional con Serial No. 12/776,259 (Expediente No. P4328R1 US) para Título de Patentes el 07 de mayo de 2010; y una solicitud internacional No. PCT/US2010/034097 (Expediente No. P4328R1 WO) el 07 de mayo de 2010[1];

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

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

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

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

PATENTE

ROLLO: 024422 CUADRO: 0748

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

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

[1] Los Cedentes por la presente autorizan a Genentech, Inc., y sus representantes y cesionarios ingresar los números de solicitudes y fecha de presentación cuando se conozcan.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

_____ Fecha

_____ Nombre: WEILAN YE

South San Francisco

05/03/2010 Fecha

(firma) Nombre: MARK DENNIS

South San Francisco

_____ Fecha

_____ Nombre: JILL FREDRICKSON

PATENTE

ROLLO: 024422 CUADRO: 0749

Expediente de Abogado No. P4328R1

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Weilan Ye**, un ciudadano de Estados Unidos, residente en 119 Barkentine Street, Foster City, CA 94404; y **Mark Dennis**, un ciudadano de Estados Unidos, residente 786 Allison Way, Sunnyvale, CA 94087 (en adelante denominados como "CEDENTES"), han inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPOS ANTI-EGFL7 HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/176,817 (Expediente No. PR4328) el 08 de mayo de 2009; y para la cual se presentó por parte de ellos una solicitud no provisional con Serial No. 12/776,259 (Expediente No. P4328R1 US) para Título de Patentes el 07 de mayo de 2010; y una solicitud internacional No. PCT/US2010/034097 (Expediente No. P4328R1 WO) el 07 de mayo de 2010[1];

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

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

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

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

PATENTE

ROLLO: 024422 CUADRO: 0750

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

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

[1] Los Cedentes por la presente autorizan a Genentech, Inc., y sus representantes y cesionarios ingresar los números de solicitudes y fecha de presentación cuando se conozcan.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

_____ _____
Fecha Nombre: WEILAN YE

South San Francisco

_____ _____
Fecha Nombre: MARK DENNIS

South San Francisco

05/05/2010 (firma)
Fecha Nombre: JILL FREDRICKSON

ARCHIVADO: 05/21/2010

PATENTE

ROLLO: 024422 CUADRO: 0751

ANTICUERPOS ANTI-EGFL7 HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona en general con el campo de la biología molecular. Más específicamente, la invención se relaciona con los anticuerpos anti-EGFL7, y usos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El desarrollo de una provisión vascular es un requisito fundamental para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Los tejidos que crecen en forma activa como embriones y tumores requieren una adecuada provisión de sangre. Satisfacen esta necesidad mediante la producción de factores pro-angiogénicos, que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes a través de un proceso llamado angiogénesis o a partir de células progenitoras a través de un proceso llamado vasculogénesis. La tubulogénesis es una etapa esencial en el desarrollo vascular. La formación de un tubo vascular es un complejo, pero suceso biológico ordenado que implica todas o muchas de las siguientes etapas: a) células endoteliales (EC, por sus siglas en inglés) proliferan de EC existentes o se diferencian de las células progenitoras; b) migración de EC; c) las EC se combinan para formar estructuras similares a una cuerda; d) los cuerdas vasculares que atraviesa tubologénesis para formar vasos con un lumen central e) los vasos o cuerdas existentes envían brotes para formar vasos secundarios (angiogénesis); f) plexo vascular primitivo atraviesa más remodelación y rediseño; y g) se junta células peri-endoteliales para revestir los tubos endoteliales, lo que proporciona mantenimientos y funciones modulatorias a los vasos, dichas células incluyen pericitos para capilares pequeños, células de músculos suaves para vasos más grandes, y células miocardiales 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).

Actualmente está bien establecido que la angiogénesis, que implica la formación de vasos sanguíneos nuevos de endotelio preexistente, está implicada en la patogénesis de una variedad de trastornos. Estos incluyen tumores sólidos y metástasis, arterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, síndromes neovasculares intraoculares, como retinopatías proliferativas,

por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés), glaucoma neovascular, rechazo inmune de tejido corneal trasplantado y otros tejidos, artritis reumatoide, y psoriasis. Folkman et al., J. Biol. Chem., 267: 10931-10934 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol., 53: 217-239 (1991); y Garner A., "Vascular diseases", En: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2da Edición (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

En el caso del crecimiento del tumor, la angiogénesis 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 neovscularización permite a las células del tumor adquirir una ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa en comparación con las células normales. Un tumor generalmente comienza como una sola célula aberrante que prolifera solamente a un tamaño de unos pocos milímetros cúbicos debido a las distancias de los lechos capilares disponibles y puede permanecer “latente” sin mayor crecimiento y diseminación por un largo período de tiempo. Algunas células tumorales luego cambian al fenotipo angiogénico para activar las células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos recientemente formados no solo permiten el crecimiento continuado del tumor primario, pero también de la diseminación y recolonización de células de tumor metástaticas. Por consiguiente, se ha observado una correlación entre la densidad de los microvasos en secciones del tumor y la supervivencia de pacientes en cáncer de mama así como en diversos tumores. Weidner et al., N. Engl. J. Med, 324: 1-6 (1991); Horak et al., Lancet, 340: 1120-1124 (1992); Macchiarini et al., Lancet, 340: 145-146 (1992). Los mecanismos precisos que controlan el cambio angioénico no se comprenden bien, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral resulta del balance netos de una multitud de inhibidores y estimuladores de angiogénesis (Folkman, 1995, Nat Med 1(1):27-31).

El proceso del desarrollo vascular está completamente regulado. Hasta el momento un número significativo de moléculas, la mayoría factores segregados por células circundantes han demostrado regular la diferenciación, proliferación, migración y combinación en estructuras similares a cuerdas de EC. Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) ha sido identificado como el factor clave implicado en la estimulación de angiogénesis

y la inducción de permeabilidad vascular. Ferrara et al., Endocr. Rev., 18: 4-25 (1997). El hallazgo de que la pérdida de incluso un solo alelo de VEGF resulta en la mortalidad embriónica señala un rol irremplazable que cumple este factor en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular. Asimismo, se ha demostrado que VEGF es un mediador clave de neovascularización asociado con tumores y trastornos intraoculares. Ferrara et al., Endocr. Rev., supra. El ARNm de VEGF es sobreexpresado por la mayoría de los tumores humanos examinados. Berkman et al., J. Clin. Invest., 91: 153-159 (1993); Brown et al., Human Pathol., 26: 86-91 (1995); Brown et al., Cancer Res., 53: 4727-4735 (1993); Mattern et al., Brit. J. Cancer , 73: 931-934 (1996); Dvorak et al., Am. J. Pathol., 146: 1029-1039 (1995).

Algunas de las etapas dura la formación de tubo del vaso son aún pobremente definidas. Particularmente, se sabe poco sobre cómo se regula la tubologénesis --como las cuerdas vasculares progresan para tornarse tubos, y qué factores regulan esta transición. En vista del rol de la vasculogenésis y la angiogénesis en muchas enfermedades y trastornos, es conveniente tener medios para reducir o inhibir uno o más de los efectos biológicos que causan estos procesos. Todas las referencias citadas en la presente, incluidas las solicitudes de patente y publicaciones se incorporan a modo de referencia en su totalidad.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La invención se basa, en parte, en una variedad de anticuerpos al EGFL7. El EGFL7 presenta un blanco terapéutico importante y ventajoso, y la invención proporciona anticuerpos como agentes terapéuticos y de diagnósticos para el uso en tratamiento de afecciones patológicas asociadas con la expresión y/o actividad de EGFL7. Por consiguiente, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación relacionados con EGFL7.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-EGFL7. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-EGFL7 que comprende un dominio variable que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de región hipervariable (HVR, por sus siglas en inglés) seleccionadas del grupo que consiste de: (i) HVR-L1 que comprende $KX_1SX_2SX_3DYX_4GDSYX_5S$, en donde X_1 es A o R; X_2 es H o Q; X_3 es G o V; X_4 se selecciona del grupo que consta de D, L, R, S, y W; y X_5 es M o V (SEC ID Nº: 210); (ii) HVR-L2 que comprende $GASX_1X_2EX_3$, en donde X_1 es N o Y; X_2 se

selecciona del grupo que consta de L, R y Y; y X_3 es Q o S (SEC ID Nº: 211); (iii) HVR-L3 que comprende QQNNEX_1PX_2T, en donde X_1 es D o E; y X_2 es F o Y (SEC ID Nº: 212); (iv) HVR-H1 que comprende G$X_1X_2X_3X_4$TYGX_5S, en donde X_1 es H o V; X_2 es R o T; X_3 se selecciona del grupo que consta de F, G, R, y S; X_4 se selecciona del grupo que consta de D, G, R, y T; y X_5 es M o Y (SEC ID Nº: 213); (v) HVR-H2 que comprende GWINX_1X_2SGVPTX_3A$X_4X_5X_6X_7X_8$, en donde X_1 se selecciona del grupo que consta de I, M, T, y W; X_2 es H o R; X_3 se selecciona del grupo que consta de I, M, T, y Y; X_4 es D o H; X_5 se selecciona del grupo que consta de D, M y T; X_6 es F o Y; X_7 es K o S; y X_8 es G o R (SEC ID Nº: 214; y (iv) HVR-H3 que comprende AX_1LGSX_2AVDX_3, en donde X_1 es N o R; X_2 es seleccionado del grupo que consta de C, S, y Y; y X_3 es A o Y (SEC ID Nº: 215). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFL7 comprende todas las seis HVR anteriormente mencionadas. En algunas realizaciones, HVR-L1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID Nº: 31 y 37-43, HVR-L2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 32 y 44-47, HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 33 y 48, HVR-H1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 34 y 49-57, HVR-H2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 35 y 58-73, y HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 36 y 74–77. En algunas realizaciones la cadena pesada comprende las siguientes secuencias de marco: FR-H1 comprende EX_1QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS, en donde X_1 es I o V (SEC ID Nº: 216); FR-H2 comprende WVRQAPGKGLEWX_1, en donde X_1 es I o V (SEC ID Nº: 217); FR-H3 comprende RFTX_1SX_2DX_3SX_4X_5TX_6YLQMNSLRAEDTAVYX_7CAR, en donde X_1 es F o I; X_2 es L o R; X_3 es N o T, X_4 se selecciona del grupo que consta de A, E, K y T; X_5 es N o S; X_6 se selecciona del grupo que consta de A, L, M, T y V; y X_7 es F o Y (SEC ID Nº: 218); y FR-H4 comprende WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº: 219). En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende las siguientes secuencias marco: FR-H1 comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID Nº: 197); FR-H2 comprende WVRQAPGKGLEWV (SEC ID Nº: 198); FR-H3 comprende RFTISX_1DNSKNTX_2YLQMNSLRAEDTAVYYCAR, en donde X_1 L o R; X_2 es seleccionado del grupo que consta de A, L, M, T y V (SEC ID Nº: 220); y FR-H4 comprende WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº: 200). En algunas realizaciones, la

cadena liviana comprende las siguientes secuencias marco: FR-L1 comprende DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID Nº: 201); FR-L2 comprende WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID Nº: 202); FR-L3 comprende GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEC ID Nº: 203); FR-L4 comprende FGQGTKVEIK (SEC ID Nº: 221) o FGQGTKVEIKR (SEC ID Nº: 204). En algunas realizaciones, la cadena liviana comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v17 o 4F11.v22 como se muestra en la Figura 15 (SEC ID Nº: 82 y 83). En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v17 o 4F11.v22 como se muestra en la Figura 16 (SEC ID Nº: 84 y 85). En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo en donde la cadena liviana comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v17 o 4F11.v22 como se muestra en la Figura 15 (SEC ID Nº: 82) y la cadena pesada comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v17 como se muestra en la Figura 16 (SEC ID Nº: 84). En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo en donde la cadena liviana comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v22 como se muestra en la Figura 15 (SEC ID Nº: 83) y la cadena pesada comprende la secuencia de dominio variable de 4F11.v22 como se muestra en la Figura 16 (SEC ID Nº: 85).

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-EGFL7 que comprende un dominio variable que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco secuencias HVR seleccionadas del grupo que consta de: (i) HVR-L1 que comprende $X_1X_2X_3X_4X_5X_6VX_7X_8X_9X_{10}ITYLX_{11}$, en donde X_1 se selecciona del grupo que consta de L, Q, R, S, y T; X_2 se selecciona del grupo que consta de P, T, y W; X_3 es H o S; X_4 es D o Q; X_5 es G o S; X_6 es L o V; X_7 es H o P; X_8 se selecciona del grupo que consta de I, L, P, T, y Y; X_9 se selecciona del grupo que consta de N, Q o S; X_{10} es seleccionado del grupo que consta de A, G, y S; y X_{11} es G o H (SEC ID Nº: 222); (ii) HVR-L2 que comprende $RVSNX_1X_2S$, en donde X_1 es D o R; y X_2 se selecciona del grupo que consta de A, G, F, I, y T (SEC ID Nº: 223); (iii) HVR-L3 que comprende $X_1QSX_2X_3VPLT$, en donde X_1 se selecciona del grupo que consta de A, G, I, K, L, N, S, T, y V; X_2 es C o T; y X_3 es F o H (SEC ID Nº: 224); (iv) HVR-H1 que comprende $GYX_1X_2X_3DX_4YX_5N$, en donde X_1 es N o T; X_2 es F o V; X_3 se selecciona del grupo que consta de I, M, R, y S; X_4 se selecciona del grupo que consta de Y, Q, y K; y X_5 es I o M (SEC ID Nº: 225); (v) HVR-H2 que comprende $GDINX_1X_2X_3X_4X_5X_6HX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$, en donde X_1 se selecciona del grupo que consta de A, L, N, y P; X_2 se selecciona del

grupo que consta de D, L, y R; X_3 se selecciona del grupo que consta de G, K, N, R, S, y Y; X_4 es G o S; X_5 se selecciona del grupo que consta de G, I, K, R, S, T, y V; X_6 se selecciona del grupo que consta de G, R, y T; X_7 se selecciona del grupo que consta de I, V, y Y; X_8 es N o S; X_9 se selecciona del grupo que consta de A, N, y Q; X_{10} es K o V; X_{11} es F o Q; X_{12} es K o T; y X_{13} se selecciona del grupo que consta de G, H, R, y S (SEC ID Nº: 226), y (vi) HVR-H3 que comprende X_1REGVYHX_2YDDYAX_3DY, en donde X_1 se selecciona del grupo que consta de A, N, y T; X_2 es D o P; y X_3 es M o W (SEC ID Nº: 227). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFL7 comprende todas las seis HVR anteriormente mencionadas. En algunas realizaciones, HVR-L1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID Nº: 100 y 106-124, HVR-L2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 101 y 125-129, HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 102 y 130–145, HVR-H1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 103 y 146-153, HVR-H2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 104 y 154-187, y HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID Nº: 105 y 188-192. En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende las siguientes secuencias marco: FR-H1 comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID Nº: 197); FR-H2 comprende WVRQAPGKGLEWX_1, en donde X_1 es I o V (SEC ID Nº: 228); FR-H3 comprende RX_1TX_2SX_3DX_4S$X_5$$X_6TX_7YX_8$QMNSLRAEDTAVYYC, en donde X_1 es F o V; X_2 es I o L; X_3 se selecciona del grupo que consta de L, R, y V; X_4 es K o N; X_5 se selecciona del grupo que consta de K, N, R, y S; X_6 es N o S; X_7 se selecciona del grupo que consta de A, L, y V; y X_8 es L o M (SEC ID Nº: 229); y FR-H4 comprende WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº: 200). En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende las siguientes secuencias marco: FR-H1 comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID Nº: 197); FR-H2 comprende WVRQAPGKGLEWV (SEC ID Nº: 198); FR-H3 comprende RFTISRDX_1SKNTX_2YLQMNSLRAEDTAVYYCAR, en donde X_1 N o K; y X_2 se selecciona del grupo que consta de A, L, y V (SEC ID Nº: 230); y FR-H4 comprende WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº: 200). En algunas realizaciones, la cadena liviana comprende las siguientes secuencias marco: FR-L1 comprende DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID Nº: 201); FR-L2 comprende

WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID Nº: 202); FR-L3 comprende GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEC ID Nº: 203); FR-L4 comprende FGQGTKVEIK (SEC ID Nº: 221) o FGQGTKVEIKR (SEC ID Nº: 204). En algunas realizaciones, la cadena liviana comprende la secuencia de dominio variable de 18F7.v6 o 18F7.v6k como se muestra en la Figura 27 (SEC ID Nº: 193 y 194). En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende la secuencia de dominio variable de 18F7.v6 o 18F7v6k como se muestra en la Figura 28 (SEC ID Nº: 195 y 196). En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo en donde la cadena liviana comprende la secuencia de dominio variable de 18F7.v6 como se muestra en la Figura 27 (SEC ID Nº: 193) y la cadena pesada comprende la secuencia de dominio variable de 18F7.v6 como se muestra en la Figura 28 (SEC ID Nº: 195). En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo en donde la cadena liviana comprende la secuencia de dominio variable de 18F7.v6k como se muestra en la Figura 27 (SEC ID Nº: 194) y la cadena pesada comprende la secuencia de dominio variable de 18F7.v6k como se muestra en la Figura 28 (SEC ID Nº: 196).

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo donde al menos una porción de la secuencia marco es una secuencia marco consenso humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la secuencia marco de consenso del subgrupo 1 k humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la secuencia marco consenso del subgrupo III humana de cadena pesada.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti–EGFL7 que es un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), por ejemplo al mismo epítopo de VEGF como bevacizumab o ranibizumab.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona un vector que comprende dicho ácido nucleico. En algunas realizaciones, la invención proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico o vector.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, la

composición comprende un portador. En algunas realizaciones, la composición está en una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para hacer un anticuerpo anti-EGFL7 mediante la expresión en una célula huésped adecuada de un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención y la recuperación del anticuerpo. En algunas realizaciones, la célula huésped es procariota. En algunas realizaciones, la célula huésped es eucariota.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular, el método comprende la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-EGFL7 de la invención a un individuo que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti–EGFL7 para el uso en el tratamiento de un tumor, un cáncer, o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consta de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal o cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

En algunas realizaciones, el tratamiento también comprende una cantidad efectiva de un segundo medicamento, en donde el anticuerpo anti-EGFL7 es un primer medicamento. En algunas realizaciones, el segundo medicamento es otro anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente anti-angiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citocina, un agonista de citosina, radioterapia citotóxica, un corticosteroide, un antiemético, una vacuna contra el cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento. En algunas realizaciones, el segundo medicamento es un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, bevacizumab. En algunas realizaciones, el segundo medicamento se administra con anterioridad o posterioridad a la administración del anticuerpo anti-EGFL7. En algunas realizaciones, el segundo medicamento se administra en forma concurrente con el anticuerpo anti-EGFL7.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de reducción o inhibición de la angiogénesis en un sujeto que padece una afección patológica asociada con angiogénesis, que comprende la administración a un sujeto de un anticuerpo de la invención, por lo tanto, se reduce o se inhibe la angiogénesis en un sujeto. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo de la

invención para el uso en el tratamiento de una afección patológica asociada con angiogénesis. En algunas realizaciones, la afección patológica es una afección neoplásica. En algunas realizaciones, la afección patológica es una afección no neoplásica. En algunas realizaciones, la afección no neoplásica se selecciona de grupo que consta de diabetes y otras retinopatías proliferativas, retinopatía de premadurez, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de córnea, neovascularización de injerto de córnea, neovascularización de retina/ de coroide.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de mejoramiento de la eficacia de un agente anti-angiogénesis en sujeto que padece una afección patológica asociada con la angiogénsis, que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención en combinación con el agente anti-angiogénsis, por lo tanto se mejora dicha actividad inhibidora del agente de anti-angiogénesis. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para el uso en el mejoramiento de la eficacia de un agente anti-angiogénesis en un sujeto que tiene una afección patológica asociada con angiogénesis. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con la angiogénesis es un tumor, cáncer o trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con angiogénesis es una afección no neoplásica. En algunas realizaciones, la afección no neoplásica se selecciona de grupo que consta de retinopatías diabéticas y otras retinopatías proliferativas, retinopatía de premadurez, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de córnea, neovascularización de injerto de cornea, neovascularización de retinal/ coroidal. En algunas realizaciones, el agente ani-angiogénesis se administra con anterioridad o posterioridad a la administración del anticuerpo anti-EGFL7. En algunas realizaciones, el agente anti-angiogénesis se administra en forma concurrente con el anticuerpo anti-EGFL7. En algunas realizaciones, el agente anti-angiogénesis s un agente anti-VEGF, un anticuerpo ani-VEGF, por ejemplo, bevacizumab o ranibizumab.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de reducción o inhibición de perfusión y permeabilidad de un tumor en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de un anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para el uso en la reducción o inhibición de perfusión y permeabilidad de un tumor en un

sujeto. En algunas realizaciones, el método o uso comprende la administración de un agente anti-angiogénesis, por ejemplo, un anti-VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, como bevacizumab.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 muestra las secuencias de aminoácidos de EGFL7 de un ratón (SEC ID Nº: 1) y de humano (SEC ID Nº. 2). Se indican las ubicaciones de EMI1, EMI2, EGF y dominios doble alfa hélice (coiled- coiled). El EGFL7 truncado no tiene los dominios doble alfa hélice. La secuencia de péptidos EMI1 (SEC ID Nº: 3), EMI2 (SEC ID Nº: 4), y p2 (SEC ID Nº: 5), P4 (SEC ID Nº: 6), p5 (SEC ID Nº: 7), y p6 (SEC ID Nº: 8) se subrayan.

La FIGURA 2 muestra una secuencia de aminoácidos del dominio **liviano** variable del consenso Kappa I humano (SEC ID Nº: 9), y 4F11.v1 (SEC ID Nº: 10). Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables se encajonan.

La FIGURA 3 muestra una secuencia de aminoácidos del dominio **pesado** variable del consenso subgrupo III humano (SEC ID Nº: 11), y 4F11.v1 (SEC ID Nº: 12). Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables se encajonan.

La FIGURA 4 muestra oligonucleótidos utilizados para conmutar posiciones en la Genoteca de Interruptor de Marco (Framework Toggle Library). La secuencia de ADN de 4F11.v1 y los oligonucleótidos utilizados para generar el interruptor de marco como se muestra. Las secuencias de aminoácidos de algunas regiones resultantes de interruptor de marco u originales también se muestran. En algunos casos los residuos de aminoácidos adicionales también se incorporan en base a como los codones degenerados fueron diseñados. Los identificadores de secuencia se muestran en paréntesis a la derecha de la secuencia correspondiente (SEC ID Nº: 13-28).

La FIGURA 5 muestra resultados que demuestran que la unión de mu4F11 a EGFL7 puede bloquearse mediante el Péptido 2 (SEC ID Nº: 5), pero no mediante la superposición de Péptidos 1 o 3 (SEC ID Nº: 29 y 30, respectivamente) o un péptido de control aleatorio.

La FIGURA 6 muestra la unión de fago que muestra 4F11.v1 Fab a EGFL7 truncado inmovilizado en una placa de microtitulación. Ambas muestras de fago 4F11.v1 muestran mayor unión a EGFL7 inmovilizado como una función de mayor

concentración de fago. Un fago de control muestra un antecedente de unión similar a los niveles del fago 4F11.v1 a bajas concentraciones de fago lo que sugiere cierta interacción fago–EGFL7 no específica.

La FIGURA 7 muestra la unión de fago que muestra 4F11.v1 Fab al dominio EMI2 o péptido p2 biotinilado ya sea a través de un amino libre o un tiol libre.

La FIGURA 8 muestra la abundancia de residuos encontrada en cada posición de marco durante el Interruptor de Marco. Se enumeran los aminoácidos introducidos en cada posición del marco durante el Interruptor de Marco.

La FIGURA 9 muestra los cambios en una secuencia CDR observados en cada una de las 6 “genotecas de posición única” (SPL, por sus siglas en inglés) para cada uno de los 3 marcos. Las genotecas se separaron por el marco utilizado (4F11.v1, 4F11.v2 y 4F11.v3). Los cambios obtenidos de cada una de las SPL respecto de la secuencia CDR particular se resaltan. Las secuencias VL y VH fuera de estos cambios fueron idénticas al marco correspondiente y ahora se muestran. Los identificadores de secuencia se muestran en paréntesis a la derecha de la secuencia correspondiente (SEC ID Nº: 31-77). Las secuencias individuales que aparecen más de una vez pueden no siempre tener un identificador de secuencia correspondiente.

La FIGURA 10 muestra el diseño de genoteca y marco para el dominio **liviano** variable de genotecas limitadas 1 y 2. La secuencia de aminoácidos consenso Kappa I humana (SEC ID Nº: 9), y 4F11.v1 (SEC ID Nº: 10) se muestran en comparación con el patrón utilizado para la genoteca 1 (SEC ID Nº: 78), y genoteca 2 (SEC ID Nº: 79). Las posiciones que se distribuyeron en forma aleatoria a todos los 20 aminoácidos se muestran con barra a través del aminoácido.

La FIGURA 11 muestra el diseño de genoteca y marco para el dominio **pesado** variable de genotecas limitadas 1 y 2. La secuencia de aminoácidos consenso subgrupo III humana (SEC ID Nº: 11), y 4F11.v1 (SEC ID Nº: 12) se muestran en comparación con el patrón utilizado para la genoteca 1 (SEC ID Nº: 80), y genoteca 2 (SEC ID Nº: 81). Las posiciones que se distribuyeron en forma aleatoria a todos los 20 aminoácidos se muestran con barra a través del aminoácido.

La FIGURA 12 muestra la frecuencia de cambios observados en posiciones aleatorias en genotecas limitadas 1 y 2. Se muestra la preferencia de los aminoácidos seleccionados en las posiciones 53 y 54 en la cadena liviana y 29,

52, y 98 en la cadena pesada. Se informa la preferencia (Sigma) para cualquier aminoácido como el número de desviaciones estándar sobre un suceso aleatorio de un residuo dado en la genoteca lo que presupone una distribución binomial de aminoácidos. La puntuación por estos métodos determina los sesgos de codón esperados y las estadísticas de muestras que establecen un consenso.

Las FIGURAS 13 & 14 muestran la inhibición de adhesión de HUVEC a EGFL7 de ratón o humano inmovilizado in vitro mediante variantes 4F11 humanizadas. Se dejo a las HUVEC (20.000 células/ pocillo) adherir a placas de 96 pocillos recubiertas con 5µg/ml EGFL7 humano o murino en la presencia de mayores concentraciones de anticuerpo. El número de células que aún adhirieron a las placas luego del lavado se contaron y se calcularon como el porcentaje de células totales colocadas en cada pocillo.

La FIGURA 15 muestra una secuencia de aminoácidos del dominio **liviano** variable del consenso Kappa I humano (SEC ID Nº: 9), 4F11.v1 (SEC ID Nº: 10), 4F11.v17 (SEC ID Nº: 82), y 4F11.v22 (SEC ID Nº: 83). Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables se encajonan.

La FIGURA 16 muestra una secuencia de aminoácidos del dominio **pesado** variable del consenso subgrupo III humano (SEC ID Nº: 11), 4F11.v1 (SEC ID Nº: 12), 4F11.v17 (SEC ID Nº: 84), y 4F11.v22 (SEC ID Nº: 85). Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables se encajonan.

La FIGURA 17 muestra una secuencia de aminoácidos del dominio **liviano** variable del consenso Kappa I humano (SEC ID Nº: 9), y el 18F7-injerto (SEC ID Nº: 86). Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables se encajonan.

La FIGURA 18 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio **pesado** variable del consenso subgrupo III humano (SEC ID Nº: 11), y el 18F7-injerto (SEC ID Nº: 87). Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables se encajonan.

La FIGURA 19 muestra oligonucleótidos utilizados para conmutar posiciones en la Genoteca de Interruptor de Marco (Framework Toggle Library). Se muestra la secuencia de 18F7-injerto y los oligonucleótidos utilizados para generar el interruptor de marco. Las secuencias de aminoácidos de algunas regiones resultantes de interruptor de marco u originales también se muestran. En algunos casos los residuos de aminoácido adicionales también se incorporan en base a como fueron diseñados los codones degenerados. Los identificadores de

secuencia se muestran en paréntesis a la derecha de la secuencia correspondiente (SEC ID Nº: 88-99).

La FIGURA 20 muestra resultados que demuestran que la unión de mu18F7 a EGFL7 puede bloquearse mediante EMI1 (SEC ID Nº: 3) o Péptido P5 (SEC ID Nº: 7), pero no mediante Péptidos P4 o P6 (SEC ID Nº: 6 y 8, respectivamente). Los fibroblastos embriónicos de pollo se transfectaron con un plásmido que contiene el ADNc de EGFL7 humano de longitud completa de HA identificado. El lisado celular preparado de células transfectadas se inmunoprecipitó con mu18F7 en la presencia de péptidos competitivos de exceso de 200 veces. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante el método western blot utilizando un anticuerpo anti-HA.

La FIGURA 21 muestra la unión de fago que muestra 18F7-injerto Fab a huEGFL7 truncado inmovilizado en una placa de microtitulación. Ambas muestras de fago 18F7-injerto muestran mayor unión a EGFL7 inmovilizado como una función de mayor concentración de fago. Un fago de control muestra un antecedente de unión similar a los niveles del fago 18F7-injerto a bajas concentraciones de fago lo que sugiere cierta interacción fago–EGFL7 no específica.

La FIGURA 22 muestra la unión de fago que muestra 18F7-injerto Fab al dominio EMI1 o péptido p5 biotinilado ya sea a través de un amino libre o un tiol libre.

La FIGURA 23 muestra la abundancia de residuos encontrada en cada posición de marco durante el Interruptor de Marco. Se enumeran los aminoácidos introducidos en cada posición del marco durante el Interruptor de Marco.

La FIGURA 24 muestra los cambios en una secuencia CDR observados en cada una de las 6 SPL para cada uno de los 3 marcos. Las genotecas se separaron mediante el marco utilizado (18F7-injerto, 18F7-K, 18F7-KV, y 18F7-KA). Los cambios obtenidos de cada una de las SPL respecto de la secuencia CDR particular se resaltan. Las secuencias VL y VH fuera de estos cambios fueron idénticas al marco correspondiente y ahora se muestran. Los identificadores de secuencia se muestran en paréntesis a la derecha de la secuencia correspondiente (SEC ID Nº: 100-192). Las secuencias individuales que aparecen más de una vez pueden no siempre tener un identificador de secuencia correspondiente.

La FIGURA 25 muestra la inhibición de adhesión de HUVEC a EGFL7 de ratón o humano inmovilizado in vitro mediante variantes 18F7 humanizadas. Se dejo a las HUVEC (20.000 células/ pocillo) adherir a placas de 96 pocillos recubiertas con 5µg/ml EGFL7 humano o murino en la presencia de mayores concentraciones de anticuerpo. El número de células que aún adhirieron a las placas luego del lavado se contaron y se calcularon como el porcentaje de células totales colocadas en cada pocillo.

La FIGURA 26 muestra la inhibición de la migración transpocillo de HUVEC. Se cultivaron HUVEC (50.000 células por pocillo) durante 16 horas en las cámaras superiores de placas de transpocillo y las membranas en las cámara superior se recubrieron con 5µg/ml de proteína de EGFL7 humano recombinante. Las diversas concentraciones de anticuerpo de control (anti-IgE) o variantes diferentes de 18F7 se agregaron al medio de cultivo en las cámaras superiores e inferiores, mientras que 20 ng/ml de VEGF-165 se agregaron a los pocillos inferiores para estimular la migración de HUVEC. Las células que migraron a las partes inferiores de las cámaras superiores se contaron y graficaron respecto de los anticuerpos (anticuerpos y concentraciones).

La FIGURA 27 muestra una secuencia de aminoácidos del dominio **liviano** variable del consenso Kappa I humano (SEC ID Nº: 9), 18F7-injerto (SEC ID Nº: 86), 18F7.v6 (SEC ID Nº: 193), y 18F7.v6k (SEC ID Nº: 194). Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables se encajonan. Cuando no se muestra la secuencia para 18F7.v6k (en las segundas y terceras partes de la alineación), la secuencia correspondiente es idéntica a secuencia para 18F7.v6.

La FIGURA 28 muestra una secuencia de aminoácidos del dominio **pesado** variable del consenso subgrupo III humano (SEC ID Nº: 11), 18F7-injerto (SEC ID Nº: 87), 18F7.v6 (SEC ID Nº: 195), y 18F7.v6k (SEC ID Nº: 196). Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables se encajonan. Cuando no se muestra la secuencia para 18F7.v6k (en las primeras y terceras partes de la alineación), la secuencia correspondiente es idéntica a la secuencia para 18F7.v6.

La FIGURA 29 muestra la inhibición del crecimiento del tumor de xenoinjerto H1299 utilizando hu18F7.v6k solo y en combinación con un anticuerpo anti-VEGF.

La FIGURA 30 muestra la inhibición del crecimiento del tumor de xenoinjerto LXFL 1674 utilizando hu18F7.v6k solo y en combinación con un anticuerpo anti-VEGF.

La FIGURA 31 muestra la inhibición de vascularización de traque neonatal utilizando hu18F7.v6k solo y en combinación con un anticuerpo anti-VEGF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para anticuerpos anti-EGFL7.

Los detalles de estos métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación se proporcionan en la presente.

Técnicas Generales

Las técnicas y procedimientos descriptos o mencionados en la presente son generalmente correctamente comprendidos y comúnmente se emplean utilizando metodología convencional por aquellos con experiencia en la técnica, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ra. edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); las 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) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definiciones

Un anticuerpo “aislado” es uno que ha sido 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 los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo será purificado (1) a más de 95% en peso del anticuerpo como se determina por el método Lowry, y más preferentemente más de 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos interna o N–terminal mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o no reducción utilizando azul Coomassie o, preferentemente tinción de plata. Anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células

recombinantes dado que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que es identificada y separada de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que generalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico asilada está de otra manera que en forma o ambiente en que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aislado, por lo tanto, se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico asilado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que generalmente expresan un anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosomal diferente de las células naturales.

El término “anticuerpo anti–EGFL7” o “anticuerpo que se une a EGFL7” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a EGFL7 con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para tratar EGFL7. En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a EGFL7 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, o ≤ 0,1 nM.

“Afinidad de unión” se refiere, generalmente, a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). Salvo que se indique del modo contrario, como se utiliza en la presente “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, un anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, con inclusión de aquellos descriptos en la presente. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociar fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos por más tiempo. Una variedad de métodos de medición de afinidad de unión son conocidos en la técnica, cualquiera de los cuales pueden utilizarse para

los fines de la presente invención. Las realizaciones ilustrativas específicas son descriptas a continuación.

En una realización el “Kd” o “valor Kd” de acuerdo con la invención se mide mediante un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA, por sus siglas en inglés) llevado a cabo con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión de solución de Fabs para antígeno mediante el equilibrio de Fab con un concentración mínima de antígeno marcado (^{125}I) en la presencia de series de titulación de antígeno no marcado, luego se captura el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). A los fines de establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se cubren durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de capturación (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9,6), y posteriormente bloqueado 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 absorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM [^{125}I]-antígeno se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab–12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés se incuba durante la noche, sin embargo, la incubación puede continuar por un periodo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Luego, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución luego se extrae y la placa se lava ocho veces con 0,1% Tween™-20 en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 µl/pocillo de centellante (MicroScint™-20; Packard), y las placas se cuentan en un contador TopCount gamma (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan 20% de unión máxima o menos son elegidas para el uso en ensayos de unión competitivos. De acuerdo con otra realización, el Kd o valor Kd se mide mediante el uso ensayo de resonancia de plamón de superficie usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 de unidades de respuesta (RU, por sus siglas en inglés). Brevemente, chips bisensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N’- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC, por sus siglas en inglés) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del

proveedor. El antígeno se diluye con 10mM de acetato de sodio, pH 4,8, en 5µg/ml (~0,2µM) antes de la inyección a una tasa de flujo de 5µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección de antígeno, se inyecta 1M etanolamina para bloquear grupos sin reacción. A los fines de las mediciones cinéticas, diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0,05% Tween™ 20 (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (BIAcore™ Evaluation Software versión 3.2) mediante el ajuste simultaneo de sensorgrama de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la relación k_{off}/k_{on}. Ver, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si una tasa excede 10^6 M^{-1} S^{-1} mediante el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, luego la tasa de asociación puede determinarse mediante una técnica de neutralización fluorescente que aumenta o disminuye la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm pase de banda) a 25°C de un anticuerpo de anti-antígeno de 20nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2 en la presencia de mayores concentraciones de antígeno como se mide en un espectómetro, como un espectómetro equipado de detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectómetro 8000-series SLM Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta de agitación.

El término “vector” como se utiliza en la presente, intenta hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha estado unido. Un tipo de vector es un “plásmido” que se refiere a un bucle de ADN encadenado doble circular en el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales pueden unirse en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacteriales que tiene un origen bacterial de replicación y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped en el momento de la introducción en la célula huésped y, por lo tanto, se replican junto con el genoma huésped. Asimismo, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Dichos vectores son mencionados en la presente como

“vectores de expresión recombinantes” (o simplemente “vectores recombinantes” o “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están generalmente en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden utilizarse indistintamente.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico” se utilizan indistintamente en la presente para hacer referencia a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN o ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que puede incorporarse a un polímero mediante polimerasa de ADN o ARN, o mediante reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender mucleótidos modificados, como nucleótidos metilados y sus análogos. Si están presentes, la modificación a la estructura nucleótido puede realizarse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede ser más modificado luego de la síntesis como la conjugación con un rotulo. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “casquetes”, sustitución de uno más de los nucleótidos que ocurren naturalmente con un análogo, modificaciones internucleótidas, como aquellas con uniones no cargadas (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.), y con uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen porciones pendientes, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladotes (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellos que contienen quelatos (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.) sí como formas no modificadas del/ de los polinucelótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo generalmente presentes en azúcares pueden ser reemplazados, por ejemplo, por grupos fosfonatos, grupos fosfatos, protegidos por grupos protectores estándar, o activados para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse a soportes sólidos o semi–sólidos. El OH terminal 5’ y 3’ puede ser fosforilado o sustituido con aminas o porciones de grupo de casquete orgánicas desde 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivarse de grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azucares de ribosa o desoxirribosa

que son generalmente conocidos en la técnica incluidos, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-allilo, 2'-fluor- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carboxílicos, azúcares alfa–anoméricos, azúcares epiméricos como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acílicos y análogos de nucleósido básico, como metil ribosida. Una o más uniones fosfodiéster pueden ser reemplazados por grupos de unión alternativos. Esos grupos de unión alternativos incluyen, sin limitación, realizaciones en donde el fosfato es reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR_2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH_2 ("formacetal"), en el cual cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que opcionalmente contiene una unión éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o aralquilo. No todas las uniones en un polinucleótido necesitan ser idénticas. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en la presente, con inclusión de ARN y ADN.

“Oligonucleótido” como se utiliza en la presente, generalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente de una sola cadena, generalmente sintéticos, que en la generalidad, pero no necesariamente, son de menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” no son mutuamente exclusivos. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y totalmente aplicable a oligonucleótidos.

El término “EGFL7” (también llamado “dominio de tipo EGF, múltiple 7) como se utiliza en la presente, salvo que específicamente o según el contexto se indique de otro modo, se refiere a cualquier polipéptido de EGFL7 nativo o variante (ya sea nativo o sintético). El término “secuencia nativa” específicamente abarca formas truncadas o segregadas que ocurren naturalmente (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes que ocurren naturalmente (por ejemplos formas unidas alternativamente) y variantes alélicas que ocurren naturalmente. El término “EGFL7 de tipo salvaje” generalmente se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de una proteína de EGFL7 que ocurre naturalmente. El término “secuencia EGFL7 de tipo salvaje” generalmente se refiere a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en EGFL7 que ocurre naturalmente.

Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se utilizan indistintamente en el sentido amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, por ejemplo anticuerpos monoclonales de longitud competa o intactos), anticuerpos

policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpo multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se describe en mayor detalle en la presente). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren de manera extensiva en la secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad para anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye en forma pareja a través de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad o regiones hipervariables (CDR o HVR se utilizan de manera indistinta en la presente) ambas en los dominios variables de cadena liviana y cadena pesada. Las porciones más conservadas de dominios variables se llaman marco (FR, por sus siglas en inglés). Los dominios variables de cadenas pesadas y livianas nativas cada uno comprende cuatro regiones FR, adoptando ampliamente una configuración β-lámina, conectados por tres HVR, que forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de la estructura de β-lámina. Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en una proximidad cercana por las regiones FR y con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (ver Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo al antigeno, pero exhiben varias funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar rápidamente. El tratamiento de pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y que es aún capaz de entrecruzar el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento de antígeno completo y un sitio de unión. En una especie Fv de dos cadenas, la región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena liviana y uno de pesada en asociación no covalente ajustada. En especies Fv de una sola

cadena, un dominio variable de cadena pesada y uno de liviana puede unirse covalentemente mediante una unión de péptido flexible de manera que las cadenas livianas y pesadas puedan asociarse en una estructura “dimérica” análoga a la de las especies FV de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En forma conjunta, las seis HVR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir al antígeno, a pesar de que con una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab 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 el agregado de unos pocos residuos en la terminal carboxi del dominio CH1 de cadena pesada con inclusión de una o más cisteínas del la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente para Fab’ en la que el/los residuos de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ generalmente fueron producidos como pares de fragmentos Fab’ que tiene cisteínas bisagras entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos del anticuerpo también son conocidos.

Las “cadenas livianas” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada puede ser asignada a uno de dos tipos claramente distintivos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácido de los dominios constantes.

Según la secuencia de aminoácido del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas. IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias otras de éstas pueden además dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, y IgA_2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden con diferentes clases de inmunoglobulinas son llamados α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, en donde la porción preferentemente retiene al menos una, preferentemente la mayoría o todas de las funciones normalmente asociadas con

esa porción cuando están presentes en un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, y Fv, diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cada única; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos del anticuerpo. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y, por lo tanto, retiene la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando están presente en un anticuerpo intacto, como unión FcRn , modulación de vida media de anticuerpo, función de ADCC y unión de complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media in vivo sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión al antígeno unido a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad in vivo al fragmento.

El término “región hipervariable”, “HVR” o “HV” cuando se utiliza en la presente se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR, tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de seis HVR, y H3 en particular se cree que tiene un rol único para conferir especificidad fina a los anticuerpos. Ver, por ejemplo, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido que ocurren naturalmente que consisten de una cadena pesada son solo 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).Un número de delineaciones de HVR están en uso y abarcadas en la presente. Las Regiones de Determinación de la Complementaridad Kabat (CDR) se basan en una variabilidad de secuencia y son las más comúnmente utilizadas (Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las AbM HVR representa un acuerdo entre HVR Kabat y bucles estructurales Chothia, y son utilizadas por el software de modelo

de anticuerpo *AbM* de Oxford Molecular. Las HVR de “contacto” se basan en un análisis de las estructuras de cristal del complejo disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

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 (Númeración Kabat)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Númeración Chotia)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender “HVR extendidas” como se indica a coninuación: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en la VH. Los residuos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat et al., supra, para cada una de estas definiciones.

Residuos de “marco” o “FR” son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se definen en la presente.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen 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 una HVR del receptor son reemplazados por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo, o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de FR de inmunoglobulina human son reemplazaos por los residuos no humanos correspondientes. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden hacerse para refinar más el desarrollo del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todos o

sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana, y todos o sustancialmente todos los FR son aquellos de una secuencia de inmuglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, 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 de los Estados Unidos N.º 6.982.321 y 7.087.409.

El término “anticuerpo monoclonal” como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido 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 que ocurren naturalmente, que pueden estar presente en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo no como una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal generalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se une a un blanco, en donde la secuencia de polipéptido de unión al blanco se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una sola secuencia de polipéptido de unión al blanco 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, como un grupo de clones hibridoma, clones de fago, o clones de ADN recombinante. Debe comprenderse que una secuencia de unión al blanco seleccionada puede además alterarse, por ejemplo para mejorar la afinidad para el blanco, para humanizar la secuencia de unión al blanco, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir la inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc. y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión al blanco alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. Por el contrario a las preparaciones del anticuerpo policlonal, que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos hacia diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal es dirigido hacia una sola determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones del anticuerpo

monoclonal son ventajosas en que generalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden preparase mediante una variedad de técnicas, con inclusión de, 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, 2da ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 4.816.567), tecnologías de muestra 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. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para la producción de anticuerpos de tipo humano o humano en animales que tienen partes o todos los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican las 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); Patente de los Estados Unidos N.º 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).

Los anticuerpos monoclonales en la presente específicamente incluyen anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras

especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 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 al antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido por, por ejemplo, la inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

Los fragmentos de anticuerpo "scFv" o “Fv de cadena única” comprende los dominios VH y VL del anticuerpo en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido scFv además comprende una unión de polipéptido entre los dominios VH y VL lo que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de scFv ver Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Un antígeno es un antígeno predeterminado al que un anticuerpo puede unirse en forma selectiva. El antígeno blanco puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto sintético o que ocurre naturalmente.

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión al antígeno, dichos fragmentos comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH – VL). Mediante el uso de una unión que es demasiado corta para permitir el pareamiento de dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a unirse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen en forma más completa en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde al anticuerpo producido por un humano y/o ha sido realizado utilizando cualquiera de las técnicas para la preparación de anticuerpos humanos como se describe en la presente. La definición de anticuerpo humano específicamente excluye un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humano. Los anticuerpos humanos pueden ser producidos

utilizando varias técnicas conocidas en el campo, con inclusión de genotecas de muestra de fago. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol*., 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol*., 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos métodos descriptos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Ver también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.,* 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración del antígenos a un animal transgénicos que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la prueba de provocación antigénica, pero cuyos loci endógenos han sido inhabilitados, por ejemplo, xenoratones inmunizados (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 6.075.181 y 6.150.584 en relación a tecnología XENOMOUSE™). Ver también, por ejemplo, Li *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) en relación con anticuerpos humanos generados a través de tecnología de hibridoma de célula B humana.

El término “numeración de residuo de dominio variable como en Kabat” o “numeración de posición de aminoácido como en Kabat”, y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena liviana de la c0mpilación de anticuerpos en Kabat et al., *supra*. Con la utilización de este sistema de numeración, la secuencia de aminoácido lineal real puede contener menos 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 sola inserción de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) luego del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) luego del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat “estándar”.

El sistema de numeración kabat generalmente se utiliza cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente residuos 1-107 de la cadena liviana y residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El “sistema de numeración EU” o “índice EU” generalmente se utiliza cuando se hace referencia a un residuo en una

región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, índice EU indicado en Kabat *et al., supra*). El “índice EU como en Kabat” se refiere a la numeración de residuo del anticuerpo EU IgG1 humano. Salvo que se indique lo contrario en la presente, las referencias a los números de residuos en el dominio variable de anticuerpos significa numeración de residuo por el sistema de numeración Kabat. Salvo que se indique lo contrario en la presente, las referencias a números de residuos en un dominio constante de anticuerpos significa la numeración de residuos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, ver Solicitud Provisoria de los Estados Unidos N.º 60/640.323, Figuras para la numeración EU).

Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que une. Ciertos anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben en forman completa o sustancial la actividad biológica del antígeno.

El término “sustancialmente similar” o “sustancialmente el mismo”, como se utilizan en la presente, denota un grado suficiente de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención, y otro asociado con un anticuerpo de referencia/ comparador), de manera que un experto en la técnica consideraría a la diferencia entre los dos valores mínina o sin importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd)- 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.

El término “sustancialmente reducido” o “sustancialmente diferente”, como se utilizan en la presente, denota un grado suficiente de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente, uno asociado con una molécula, y otro asociado con una molécula de referencia/ comparador), de manera que un experto en la técnica consideraría a la diferencia entre los dos valores de importancia estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). 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.

Las “funciones efectoras” del anticuerpo 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 varían con el isótopo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: Citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por sus siglas en inglés) y unión C1q; unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés),; fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B), y activación de célula B.

El término “región Fc” se utiliza en la presente para definir a la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, con inclusión de la regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. A pesar de que los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena de pesada de IgG humano generalmente se define para expandirse desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, a la terminal carboxilo del mismo. La lisina de terminal C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede extraerse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante el diseño recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos pueden comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, las poblaciones de anticuerpo sin residuos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con el residuo K447 y sin éste.

Una “región Fc funcional” posee una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. Las “funciones efectoras” ejemplares incluyen unión C1q; CDC; unión de receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse utilizando varios ensayos como se describe, por ejemplo, en las definiciones en la presente.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de una región Fc que se encuentra en la

naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humano de secuencia nativa (alotipo A y no A) región Fc de IgG2 humano de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humano de secuencia nativa; región Fc de IgG4 humano de secuencia nativa así como variantes que ocurren naturalmente del mismo.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácido que difiere de una región Fc de secuencia nativa por al menos una modificación de aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácido. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, desde aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente desde aproximadamente uno a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en la presente poseerá preferentemente al menos aproximadamente 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc del polipéptido original, y más preferentemente al menos aproximadamente 90% de homología con el mismo, más preferentemente al menos aproximadamente 95% de homología con el mismo.

“Receptor Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones FcR es uno que se une al anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, con inclusión de las variantes alélicas y formas unidas alternativamente de aquellos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (“un receptor inhibidor”) que tiene secuencias de aminoácido similares que difieren en forma primaria en los dominios citoplásmicos de las mismas. Un receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor (ITAM, por sus siglas en inglés) en el dominio citoplásmico. Un receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunoreceptor (ITIM, por sus siglas en inglés) en el dominio citoplásmico. (ver, por ejemplo, Daëron*, Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Las FcRs 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, con inclusión de aquellos identificados en el futuro, están abarcado por el término "FcR" en la presente.

El término "receptor Fc" o “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternales al feto (Guyer *et al., J. Immunol*. 117:587 (1976) y Kim *et al., J. Immunol*. 24:249 (1994)) y regulación de homeostasis de inmunoglobulinas. Métodos de medición de la unión a FcRn son conocidos (ver, por ejemplo, Ghetie and Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al*.).

La unión a FcRn humano in vivo y la vida media de suero de polipéptidos de unión de alta afinidad de FcRn humano pueden ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humans transectadas que expresan FCRN humano, o en primates a los que se les administra polipétidos con una región Fc variante. WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcRs. Ver también, por ejemplo, Shields *et al. J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan una función o funciones efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleadas de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), monocitos, células T citotóxicas, y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de la fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que el Ig segregado unido a receptores Fc (FcRs) presente en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilo, macrófagos) le permiten a las células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula blanco que tiene un antígeno y posteriormente matar la célula blanco con citotoxinas. Las células primarias para la mediación de ADCC, células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La expresión FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, un ensayo de ADCC in vitro, como el descripto en la Patente de los

Estados Unidos N.º 5.500.362 o 5.821.337 o Patente de los Estados Unidos N.º 6.737.056 (Presta), puede llevarse a cabo. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen PBMC y células NK. En forma alternativa, o adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo de animal como el descripto en Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula blanco en presencia de un complemento. La activación del trayecto del complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase adecuada), que se unen a su antígeno cognado. A los fines de evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC, como el descripto en Gazzano-Santoro *et al*., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Las variantes de polipéptido con secuencias de aminoácidos de región Fc alterada (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de unión C1q aumentada o disminuida son descriptos en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 6.194.551 B1 y WO 1999/ 51642. Ver también, por ejemplo, Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

El término "anticuerpo que comprende 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) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante el diseño recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Por consiguiente, 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 eliminado, o una mezcla de anticuerpos con residuo K447 o sin éste.

Un "marco humano aceptante" para los fines de la presente es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco VL o VH de un marco de inmuglobulina humana, o de un marco consenso humano. Un marco humano aceptante "derivado de" un marco de inmunoglobulina humano o marco consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos preexistentes. Cuando existan cambios de los aminoácidos preexistentes, preferentemente no más de 5 y preferentemente 4 o menos, o 3 o menos, cambios de aminoácidos pre-existentes están presentes. Cuando los cambios de aminoácido están presentes en un VH,

preferentemente están solamente en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H, por ejemplo, los residuos de aminoácido en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el marco humano aceptor VL es idéntico en secuencia a la secuencia marco de inmunoglobulina humana VL o secuencia marco consenso humana.

Una “secuencia consenso humana” es un marco que representa el residuo de aminoácido que ocurre más comúnmente en una selección de secuencias de marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.* En una realización, para el VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat *et al.* En una realización, para el VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat *et al.*

Un “marco consenso de subgrupo III VH” comprende una secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácido en el subgrupo III de pesada variable de Kabat *et al.* En una realización, el marco consenso de subgrupo III de VH de secuencia de aminoácido comprende al menos una porción o todas de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID Nº: 197)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEC ID Nº: 198)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEC ID Nº: 199-H3-WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº: 200).

Un “marco consenso de subgrupo I de VL” comprende una secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácido en el subgrupo I kappa de liviano variable de Kabat *et al.* En una realización, el marco consenso de subgrupo I de VH de secuencia de aminoácido comprende al menos una porción o todas de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID Nº: 201)-**L1**-WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID Nº: 202)-**L2**-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEC ID Nº: 203)-**L3**-FGQGTKVEIK (SEC ID Nº: 204).

Una “muestra biológica” (indistintamente llamada “muestra” o “muestra celular o tisular”) abarca una variedad de tipos de muestra obtenidos de un individuo y pueden utilizarse en el ensayo de diagnóstico o monitoreo. La definición abarca muestras de sangre u otros líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido como un espécimen de biopsia o cultivos de tejido o

células derivadas de los mismos, y progenie de los mismos. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas en cualquier manera luego de su obtención, como por tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento por ciertos componentes, como proteínas o polinucleótidos, o empapado en matriz semisólida o sólida para los fines del seccionamiento. El término “muestra biológica” abarca una muestra clínica, y también incluye células en el cultivo, células supernatantes, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico, y muestras de tejido. La fuente de la muestra biológica puede ser sólida como de un órgano fresco, congelado y/o preservado o muestra de tejido, o biopsia o aspirado, sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales como fluido espinal cerebral, fluido amniótico, fluido peritoneal, o influido intersticial, células de cualquier momento en gestación o desarrollo del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastático. La muestra biológica puede contener compuestos que no se mezclan naturalmente con el tejido en la naturaleza como conservantes, anticoagulantes, buffers, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

A los fines de la presente una “sección” de una muestra de tejido significa una sola parte o pieza de una muestra de tejido, por ejemplo, una fina capa del tejido o células cortados de una muestra de tejido. Se entiende que múltiples secciones de muestras de tejido pueden tomarse y someterse a análisis de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, la misma sección de la muestra de tejido se analiza en el nivel morfológico o molecular, o se analiza con respecto a la proteína o ácido nucleico.

La palabra “rótulo” cuando se utiliza en la presente se refiere a un compuesto o composición que se conjuga o fusiona directa o indirectamente a un reactivo, como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al que se conjuga o fusiona. El rótulo puede por si solo ser detectable (por ejemplo, rótulos de radioisótopo o rótulos fluorescentes) o en el caso del rotulo enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o composición que es detectable.

Un “medicamento” es un fármaco activo para tratar el trastorno en cuestión o síntomas, o efectos colaterales.

Un “trastorno” o “enfermedad” es una afección que se beneficiaría con el tratamiento con una sustancia/ molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos agudos y crónicos incluidos aquellas afecciones patológicas que

predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratarse en la presente incluyen tumores malignos y benignos; carcinoma, blastoma, y sarcoma.

Los términos “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refiere a trastornos que están asociados en cierto grado a la proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

“Tumor” como se utiliza en la presente se refiere a toda proliferación y crecimiento celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y todos los tejidos y células cancerosos y precancerosos. Los términos “cáncer”, “canceroso”. “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no son mutuamente exclusivos como se hace referencia en la presente.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección patológica en mamíferos que es típicamente caracterizada por la proliferación /crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Más particularmente ejemplos de dichos cánceres incluyen cáncer celular escamoso, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer pituitario, cáncer de esófago, astrocitoma, sarcoma de tejido blando, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer de cerebro, cáncer de endometrio, cáncer de testículos, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula, cáncer gástrico, melanoma, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello. La desregulación de angiogénesis puede llevar a muchos trastornos que pueden tratarse mediante composiciones y métodos de la invención. Estos trastornos incluyen trastornos no neoplásicos y neoplásicos. Los neoplásicos incluyen sin limitación aquellos descriptos anteriormente. Los trastornos no neoplásicos incluyen sin limitación hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés), psoriasis, placas psoriáticas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, diabetes y otras retinopatías proliferativas con inclusión de retinopatía de premadurez, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular

relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de cornea, neovascularización de injerto de cornea, rechazo de injerto de cornea, neovascularización de retina/ de coroide, neovascularización de ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (AVM, por sus siglas en inglés), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroide (con inclusión de la enfermedad de Grave), trasplante de cornea y otro tejido, inflamación crónica, inflamación de pulmón, lastimadura de pulmón aguda /ARDS, sepsis, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociada con accidente cerebro vascular agudo / herida de cabeza cerrada / trauma), inflamación sinovial, formación de pannus en RA, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refretaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, tercer espacio de enfermedad de fluido (pancreatitis, síndrome de compartimiento, quemaduras, enfermedad de intestino), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica, como IBD (enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad de intestino inflamatoria, síndrome nefrótico, crecimiento de masa de tejido no deseado aberrante (no-cáncer), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición de crecimiento capilar, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico fibroplasias retrolentales, esclerodermia, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, efusión pericardial (como la asociada con pericarditis), y efusión pleural.

El término trastornos “consuntivos” (por ejemplo, síndrome consuntivo, caquexia, sarcopenia) se refiere a un trastorno causado por la pérdida de peso no saludable o no deseada o pérdida de masa celular corporal. En ancianos así como en pacientes con SIDA o cáncer, la enfermedad consuntiva puede resultar en la pérdida de peso corporal no deseada, con inclusión de los componentes grasos y libres de grasa. Las enfermedades consuntivas pueden resultar en la ingesta inadecuada de comida y/o cambios relacionados con la enfermedad y/o proceso de envejecimiento. Los pacientes con cáncer y pacientes con SIDA así como pacientes que han sufrido una cirugía profunda o que tienen infecciones crónicas, enfermedades inmunológicas, hipertiroidismo, enfermedad de Crohn, enfermedad psicogénica, deficiencia cardíaca crónica u otro trauma severo, frecuentemente sufren de una enfermedad consuntiva que a veces se denomina caquexia, un trastorno metabólico o a veces de la alimentación. La caquexia asimismo se

caracteriza por el hipermetabolismo e hipercatabolismo. A pesar de que la caquexia y las enfermedades consutivas se utilizan frecuentemente en forma indistinta para hacer referencia a afecciones consuntivas, hay al menos un cuerpo de investigación que diferencia la caquexia del síndrome consuntivo como la pérdida de masa libre de grasa, y particularmente masa celular corporal (Mayer, 1999, J. Nutr. 129(1S Suppl.):256S-259S). La sarcopenia, es incluso otro trastorno que puede afectar el envejecimiento de un individuo, típicamente se caracteriza por la pérdida de masa muscular. La enfermedad consuntiva en etapa final como se describe anteriormente puede desarrollarse en individuos que padecen ya sea caquexia o sarcopenia.

Como se utiliza en la presente “tratamiento” se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula a tratarse, y puede llevarse a cabo ya sea por profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos convenientes del tratamiento incluyen la prevención de la ocurrencia o recurrencia de la enfermedad, alivio de lo síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o alivio del estado de enfermedad, y remisión o prognosis mejorada. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Un “agente anti-angiogénesis” o “inhibidor de angiogénesis” se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis, o permeabilidad vascular no deseable, ya sea directa o indirectamente. Por ejemplo, un agente anti-angiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista a un agente angiogénico como se definió anteriormente, por ejemplo, anticuerpos a VEGF, anticuerpos a receptores VEGF, moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706). Los agentes anti–angiogénesis también incluyen inhibidores de angiogénesis nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina. Ver, por ejemplo, Klagsbrun y D’Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3 que enumera la terapia ani-angiogénica en melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 2 que enumera los factores antiangiogénicos), y Sato Int. J. Clin.

Oncol., 8:200-206 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 enumera los agente anti-angiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

Un “individuo”, “sujeto”, o “paciente” es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, sin limitación, animales de granja (como, vacas), animales de deporte, mascotas (como, gatos, perros y caballos), primates ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un humano.

Una “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y por periodos de tiempo necesario, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista puede variar de acuerdo con factores, como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/ molécula, agonista o antagonista de generar un respuesta conveniente en un individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualquier efecto tóxico o dañino de la sustancia/ molécula, agonista o antagonista es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad efectiva profilácticamente” se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y por periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Generalmente, pero no necesariamente, dado que una dosis profiláctica se utiliza en sujetos con anterioridad o en un primer estado de la enfermedad, la cantidad terapéuticamente efectiva será menos que la cantidad terapéuticamente efectiva.

El término “agente citotóxico” como se utiliza en la presente se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término intenta incluir isótopo radioactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radioactivos de Lu, agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicin u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos como enzimas nucleotícas, antibióticos y toximas, como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacterial, fungicida, vegetal o animal, con inclusión de fragmentos o variantes e los mismos, y varios agentes antitumor y anticáncer descriptos a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

Una “toxina” es una sustancia capaz de tener un efecto dañino en el crecimiento o proliferación de una célula.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos, como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas, como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas con inclusión de altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacin y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (con inclusión del análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, scopolectin, y 9-aminocamptotecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (con inclusión de sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (con inclusión de los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; spongistatina; mostazas nitrogenadas, como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimnustina; antibióticos, como antibióticos de enedine (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma1I y calicheamicina omegaI1 (ver, por ejemplo, Nicolaou *et al*., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor alpha-4 integrina oral; dinemicina, con inclusión de dinemicina A; una esperamicina; así como neocarzinostatin cromofor y cromoforos de antibiótico de cromoproteina enedine relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (con inclusión de ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de doxorubicin HCl liposoma (DOXIL®), liposomal doxorubicina TLC D-99 (MYOCET®), liposomal doxorubicina pegilada (CAELYX®), y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina,

marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona, y 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico, como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos pirimidina, como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales, como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides, como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; pfenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazonica; triaziquona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; tricotecenes (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartícula diseñada con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platinio, como cisplatina, oxaliplatina (por ejemplo, ELOXATIN®), y carboplatina; vincas, que previenen que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, con inclusión de vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluormetilornitina (DMFO); retinoides, como ácido retinoico, con inclusión de bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos, como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledronico /zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®),

pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquéllos que inhiben la expresión de genes en los trayectos de señalización implicados en la proliferación celular aberrante, como PKC-alpha, Raf, H-Ras, y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R, por sus siglas en inglés); vacunas, como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia de gen, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo , LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor Bcl-2, como sodio de oblimersen (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (ver definición a continuación); inhibidores de tirosina quinasa (ver definición a continuación); inhibidores de serina-treonina quinasa, como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de farnesiltransferas, como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, como CHOP, una abreviación para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona; y FOLFOX, una abreviación para un régimen de tratamiento con oxaliplatina (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

Agentes quimioterapéuticos como se define en la presente incluyen “agentes anti-hormonales” o “terapéuticos endocrino” que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos que las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas mismo, incluidas sin limitación: anti-estrógenos con perfil agonista/antagonista mezclado, con inclusión de tamoxifen (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifen, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno, y moduladores de receptor de estrógeno receptivos (SERMs), como SERM3; anti-estrógenos puros sin propiedades agonistas, como fulvestrant (FASLODEX®), y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés), inhibir la unión a ADN, aumentar el rendimiento de ER, y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de aromatasa, con inclusión de aromatasa esteroide, como formestano y exemestano (AROMASIN®), e

inhibidores de aromatasa sin esteroide, como anastrazol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, y 4(5)-imidazoles; agonistas de hormona de liberación de hormona leuteinizante, con inclusión de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelin, buserelin, y tripterelin; estereoides sexuales, con inclusión de progestinas, como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos, como dietilstilbestrol y premarin, y andrógenos/retinoides, como fluoximesterona, todo ácido transretionico y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores por disminución de receptor de estrógeno (ERD, por sus siglas en inglés); anti-andrógenos, como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se utiliza en la presente se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (como una célula que expresa EGFL7) ya sea in Vitro o in vivoPor lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca de manera significativa el porcentaje de células (como una células que expresa EGFL7) en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), como agentes que inducen el arresto G1 y el arresto de la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposido, y bleomicina. Aquellos agentes que detiene G1 también se esparcen en la detención de la fase S; por ejemplo, agentes alquilantes, como tamoxifen, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Asimismo, puede encontrarse información en Mendelsohn and 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 contra el cáncer los cuales derivan del arbol tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan los

microtúbulos mediante la prevención de la depolimerización, que da por resultado la inhibición de la mitosis en las células.

El “Doxorubicin” es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de doxorubicin es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-α-L-lixo-hexapiranosilo)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxyacetilo)-1-metoxi-5,12-nafthcenediona.

El término “polipéptido que comprende región Fc” se refiere a un polipéptido, como un anticuerpo o inmunoadhesina (ver definiciones a continuación), que comprende una región Fc. La lisina de terminal C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o mediante el diseño recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc de acuerdo con esta invención puede comprende polipéptidos con K447, con todo el K447 eliminado, o una mezcla de anticuerpos con residuo K447 o sin éste.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, la palabra “comprender” o variaciones, como "comprende" o "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un número entero establecido o grupo de números enteros, pero no excluye cualquier otro número entero o grupos de números enteros.

Generación de anticuerpos variantes que exhiben respuesta HAMA mínima o ausente

La reducción o eliminación de respuesta HAMA es un aspecto significativo del desarrollo clínico de agentes terapéuticos adecuados. Ver, por ejemplo, Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988; Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495. Como se describe en la presente, la invención proporciona anticuerpos que se humanizan de manera que la respuesta HAMA se reduce o elimina. Las variantes de anticuerpos pueden además obtenerse mediante métodos rutinarios conocidos en la técnica, alguno de los cuales se describen a continuación.

Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo como se describe en la presente puede servir como una secuencia de partida (original) para la diversificación del marco y/o secuencia(s) hipervariable(s). Una secuencia marco seleccionada a la que se une un secuencia hipervariable de partida se refiere en la presente como un marco humano aceptante. A pesar de que los marcos humanos aceptantes pueden originarse o derivar de inmunoglobulina humana (las regiones de VL y/ VH de los mismos), preferentemente, los marcos humanos aceptantes se originan o derivan de una secuencia de marco consenso humana, como marcos que han demostrado tener mínima o ninguna inmunogenicidad en pacientes humanos.

Cuando el aceptante deriva de una inmunoglobulina humano, uno puede seleccionar opcionalmente una secuencia marco human que se selecciona en base a su homología con la secuencia marco donante mediante el alineamiento de la secuencia marco donante con varias secuencias marco humanas en una colección de secuencias de marco humanas, y seleccionar la secuencia marco más homóloga como el aceptante.

En una realización, los marcos de consenso humano en la presente se originan o derivan de secuencias marco consenso de subgrupo I kappa de VL y/ de subgrupo III de VH.

Por o tanto, el marco humano aceptante de VH puede comprender una, dos, tres o todas las secuencias de marco:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID Nº: 197),

FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEC ID Nº: 198),

FR3 que comprende FR3 comprende RFTIS**X1**D**X2**SKNT**X3**YLQMNSLRAEDTAVYYC (SEC ID Nº: 205), en donde X1 es A o R, X2 es T o N, y X3 es A o L,

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº: 200).

En una realización, el marco humano aceptante de VH comprende una, dos, tres o todas las secuencias marco:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID Nº: 197),

FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEC ID Nº: 198),

FR3 que comprende RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEC ID Nº: 231), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEC ID Nº: 206), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEC ID Nº: 207),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEC ID Nº: 208), o

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEC ID Nº: 209)

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº: 200).

El marco humano aceptante de VL puede comprender una, dos, tres o todas las secuencias marco:

FR1 que comprende DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID Nº: 201),

FR2 que comprende WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID Nº: 202),

FR3 que comprende GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEC ID Nº: 203),

FR4 que comprende FGQGTKVEIK (SEC ID Nº: 204).

A pesar de que un aceptante puede ser idéntico en secuencia a la secuencia de marco humana seleccionada, ya sea que provenga de una inmunoglobulina humana o un marco consenso humano, la presente invención contempla que la secuencia aceptante puede comprende sustituciones de aminoácidos pre-existentes relativas a la secuencia de inmunoglobulina humana o secuencia marco consenso humana. Estas sustituciones pre-existentes son preferentemente mínimas; generalmente cuatro, tres, dos o una diferencia de aminoácidos solamente relativa a la secuencia de inmunoglobulina humana o secuencia marco consenso.

Los residuos de región hipervariable de anticuerpo no humano se incorporan en los marcos humanos aceptantes en el VL y/o VH. Por ejemplo, uno puede incorporar residuos correspondientes a los residuos de CDR Kabat, los residuos de bucle de hipervariable de Chotia, y los residuos Abm, y/o residuos de contacto. En forma opcional, los residuos de región hipervariable extendida se incorporan de la siguiente manera: 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3).

Mientras que la “incorporación” de residuos de región hipervariable se explican en la presente, se apreciará que puede lograrse de varias maneras, por ejemplo, ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos deseada puede generarse mediante la mutación del ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable de ratón de manera que los residuos de marco de la misma se cambien a los residuos de de marco humano aceptante, o mediante la mutación

del ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable humana de manera que los residuos del dominio hipervariable se cambian a residuos no humanos, o mediante la sinterización del ácido nucleico que codifica la secuencia deseada, etc.

En los ejemplos en la presente, las variantes injertadas en la región hipervariable se generaron mediante la mutagénesis de Kunkel del ácido nucleico que codifica las secuencias aceptantes humanas, utilizando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel *et al., Methods Enzymol*. 154:367-382 (1987). Los cambios adecuados introducidos dentro del marco y/o la región hipervariable, utilizando técnicas de rutina, para corregir y reestablecer las interacciones de antígeno y la región hipervariable adecuadas.

La muestra de fago(mid) (también mencionada en la presente como muestra de fago en algunos contextos) puede utilizarse como un método conveniente y rápido para generar y controlar muchos anticuerpos variantes potenciales diferentes en una genoteca generada mediante randomización de secuencia. Sin embargo, otros métodos para hacer y clasificar los anticuerpos alterados están disponibles para el experto.

La tecnología de muestra de fago(mid) ha proporcionado una herramienta poderosa para generar y seleccionar proteínas noveles que se unen a un ligando, como un antígeno. El uso de técnicas de muestra de fago(mid) permite la generación de grandes genotecas de variantes de proteína que puede clasificarse rápidamente clasificarse para aquellas secuencias que unen a la molécula banco con alta afinidad. Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos variantes son generalmente fusionados a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de recubrimiento viral, como la proteína del gen III o proteína del gen VIII. Se han desarrollado los sistemas de muestra de fagomid monovalente donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o polipéptido se fusiona a una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de la proteína del gen III. (Bass, S., *Proteins,* 8:309 (1990); Lowman y Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology,* 3:205 (1991)). En un sistema de muestra de fagomid monovalente, la fusión de gen se expresan en niveles bajos y proteínas de gen III de tipo salvaje también se expresan de manera que la inefectividad de las partículas se retiene. Los métodos de generación de genotecas e péptido y clasificación de genotecas han sido descriptas en muchas patentes (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º5.723.286, Patente de los Estados Unidos N.º

5.432.018, Patente de los Estados Unidos N.º 5.580.717, Patente de los Estados Unidos N.º5.427.908 y Patente de los Estados Unidos N.º 5.498.530).

Las genotecas de anticuerpos polipéptidos de unión al antígeno se han preparado de diversas maneras con inclusión de la alteración de un solo gen mediante la inserción de secuencias de ADN aleatorias o mediante la clonación de una familia de genes relacionados. Los métodos de muestra de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno usando muestra de fago(mid) han sido descriptos en las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.750.373, 5.733.743, 5.837.242, 5.969.108, 6.172.197, 5.580.717, y 5.658.727. La genoteca se clasifica por la expresión de anticuerpos o proteínas de unión al antígeno con las características deseadas.

Los métodos de sustitución de un aminoácido de elección en un ácido nucleico patrón son muy conocidos en la técnica, algunos de las cuales se describen en la presente. Por ejemplo, los residuos de región hipervariable pueden sustituir utilizando el método Kunkel. Ver, por ejemplo, Kunkel *et al., Methods Enzymol*. 154:367-382 (1987).

La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los grupo de codón designados para los residuos de región hipervariable a alterarse. Un grupo de codón es un grupo de secuencias triplete de nucleótido diferentes utilizadas para codificar los aminoácidos variantes deseados. Los grupos de codones pueden ser representados utilizando símbolos para designar los nucleótidos particulares o mezclas de nucleótidos como se muestra a continuación de acuerdo con el código IUB.

<u>CÓDIGOS IUB</u>

G Guanina

A Adenina

T Timina

C Citosina

R (A o G)

Y (C o T)

M (A o C)

K (G o T)

S (C o G)

W (A o T)

H (A o C o T)

B (C o G o T)

V (A o C o G)

D (A o G o T)

N (A o C o G o T)

Por ejemplo, en el grupo de codón DVK, D puede ser nucleótidos A o G o T, V puede ser A o G C; y K puede ser G o T. Este grupo de codones puede estar presente en 18 codones diferentes y puede codificar aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, y Cys.

Los grupos oligonucleótido o cebadores pueden sintetizarse utilizando métodos estándar. Un grupo de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis de fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las combinaciones posibles de tripletes de nucleótidos proporcionados por el grupo de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con la “degeneración” de nucleótido seleccionado en ciertas posiciones es muy conocida en la técnica. Dichos grupos de nucleótidos que tiene ciertos grupos de codones pueden sintetizarse utilizando sintetizantes de ácido nucleico comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un grupo de oligonucleótidos sintetizados que tiene un grupo de codón particular generalmente incluye una pluralidad de oligonucleótios con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el grupo de codones dentro de la secuencia completa. Los oligonucleótidos, como se utilizan de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación a un patrón de ácido nucleico de dominio variable y también incluyen los sitios de enzima de restricción para fines de clonación.

En un método, las secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes pueden crearse mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es muy conocida como lo describe Zoller *et al. Nucleic Acids Res*. 10:6487-6504(1987). Brevemente, las secuencias de ácido nucleico que codifican los aminoácidos variantes se crean mediante la hibridación de un grupo de oligonucleótidos que codifica los grupos de codón deseados a un patrón de ADN, donde el patrón es la forma de una sola cadena del plásmido que contiene una secuencia patrón de ácido nucleico de región variable. Luego de la hibridación, la polimerasa de ADN se utiliza para sintetizar una segunda cadena complementaria completa del patrón que por lo tanto incorporará el cebador de oligonucleótido y

contendrá los grupos de codones como fueron proporcionados por el grupo de oligonucleótidos.

Generalmente, se utilizan oligonucleótidos de menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios al patrón en cada lado del nucleótido(s) que codifica para la mutación o las mutaciones. Esto asegura que el oligonucleótido hibridice adecuadamente a la molécula patrón de ADN de una sola cadena. Los oligonucleótidos son fácilmente sintetizados utilizando técnicas conocidas en la técnica como las descriptas por Crea et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

El patrón de ADN es generado por aquellos vectores que derivan de los vectores M13 del bacteriófago (los vectores M13mp18 y M13mp19 comercialmente disponibles son adecuados), o aquellos vectores que contiene un origen de fago de una sola de cadena de replicación como lo describe Viera *et al.*, *Meth. Enzymol.,* 153:3 (1987). Por lo tanto, el ADN que debe mutarse puede insertarse en uno de estos vectores a los fines de generar un patrón de una sola cadena. La producción del patrón de una sola cadena que se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al*., anteriores.

A los fines de alterar la secuencia de ADN nativa, el oligonucleótido se hibridiza a un patrón de una sola cadena en condiciones de hibridación adecuadas. Una enzima polimerizante de ADN, generalmente polimerasa de T7 DNA o el fragmento Klenow de polimerasa I de ADN luego se agrega para sintetizar la cadena complementaria del patrón utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Por lo tanto, se forma una molécula heterodúplex de manera que una cadena de ADN codifica la forma mutada del gen 1, y la otra cadena (el patrón original) codifica la secuencia no alterada, nativa del gen 1. Esta molécula heterodúplex luego se transforma en una célula huésped adecuada, generalmente una procariota como *E. coli* JM101. Luego de cultivar las células, se colocan en placas de agarosa y se clasifican utilizando el cebador de oligonucleótido radiomarcado con un Fosfato 32 para identificar las colonias bacteriales que contienen el ADN mutado.

El método descripto en forma inmediatamente anterior puede modificarse de manera que una molécula homodúplex se crea en donde ambas cadenas del plásmido contienen la mutación o mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: El oligonucleótido de una sola cadena se aliena al patrón de una sola

cadena como se describió anteriormente. Una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, deoxirriboadenosina (dATP), deoxirriboguanosina (dGTP), y deoxirribotimidina (dTT), se combina con una tiodeoxiribocitosina modificada llamada dCTP-(aS) (que puede obtenerse de Amersham). Esta mezcla se agrega al complejo de patrón–oligonucleótido. Al momento del agregado de polimerasa de ADN a esta mezcla, una cadena de ADN idéntica al patrón excepto por las bases mutadas se genera. Asimismo, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerla de la digestión de endonucleasa de restricción. Luego de que la cadena de patrón del heterodúplex de doble cadena se fragmenta con una enzima de restricción apropiada, la cadena de patrón puede digerirse con nucleasa ExoIII u otra nucleasa adecuada pasada la región que contiene el o los sitios a mutagenizarse. La reacción luego se detiene para dejar una molécula que solo es parcialmente de cadena única. Un homodúplex de ADN de doble cadena completo luego se forma utilizando polimerasa de ADN en la presencia de los cuatros trifosfatos desoxirribonucleótidos, ATP y ligasa de ADN. Esta molécula homodúplex puede luego transformarse en una célula huésped adecuada.

Como se indicó anteriormente la secuencia del grupo de oligonucleótido es de una longitud suficiente para hibridizar el ácido nucleico patrón y pueden también, pero no necesariamente contener sitios de restricción. El patrón de ADN puede ser generado por aquellos vectores que derivan de los vectores M13 de bacteriófago o vectores que contienen origen de fago de una sola cadena de replicación como lo describe Viera *et al. Meth. Enzymol*., 153:3 (1987). Por lo tanto, el ADN que debe mutarse puede insertarse en uno de estos vectores a los fines de generar un patrón de una sola cadena. La producción del patrón de una sola cadena se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al*., *supra*.

De acuerdo con otro método, una genoteca puede generarse mediante la provisión de grupos de nucleótidos de ida y vuelta, cada grupo tiene una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferentes secuencias establecidas por grupos de codones proporcionados dentro de la secuencia de oligonucleótidos. Los grupos de oligonucleótidos de ida y vuelta junto con una secuencia de ácido nucleico patrón de dominio variable pueden utilizarse en una reacción de cadena de polimerasa para generar una “genoteca” de productos PCR. Los productos PCR pueden denominarse “casetes de ácido nucleico”, ya que pueden fusionarse con otras secuencias de ácido nucleico

relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de recubrimiento viral y dominios de dimerización utilizando las técnicas de biología molecular estándar establecidas.

La secuencia de cebadores de PCR incluye uno o más de los grupos de codones diseñados para el solvente accesible y posiciones altamente diversas en una región hipervariable. Como se describió anteriormente, un grupo de codón es un grupo de secuencias triplete de nucleótido diferentes utilizadas para codificar los aminoácidos variantes deseados.

Los selectores de anticuerpos que cumplen con el criterio deseado. Según la selección a través de las etapas de clasificación/ selección adecuadas pueden aislarse y clonarse utilizando técnicas recombinantes estándar.

Fragmentos de anticuerpos

La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse por medios tradicionales, como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias es ventajoso usar fragmentos de anticuerpos, más que los anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una limpieza rápida y puede llevar a un acceso mejorado a los tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, ver Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

Diversas técnicas se han desarrollado para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos derivaron a través de la 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 pueden ahora producirse directamente por células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden todos expresarse y segregarse de E. coli, por lo tanto permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las genotecas de fago de anticuerpo como se explicó anteriormente. En forma alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente del cultivo de célula huésped recombinante. El fragmento Fab y $F(ab')_2$ como mayor vida media in vivo que comprende residuos de epitope de unión a receptor de reciclaje se describen en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.869.046. Otras

técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Ver WO 93/16185: Patente de los Estados Unidos N.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas dos especies con sitios de combinación intactos que son carentes de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuados para la unión no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión scFv pueden construirse para proporcionar la fusión de una proteína efectora en cualquier terminal amino o 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 de los Estados Unidos N.º5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespcíficos o bispecíficos.

Anticuerpos Humanizados

La invención abarca anticuerpos humanizados. Varios métodos para la humanización de anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humano generalmente se denominan en la presente residuos de "importación", que generalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización básicamente puede llevarse a cabo siguiendo el método de Winter y cotrabajadores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), mediante la sustitución de secuencias de región hipervariable para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos N.º4.816.567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto livianos como pesados, a utilizase en la realización de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor es analizada respecto

de la genoteca completa de secuencias de dominio variable conocidas. La secuencia humana más cercana a la del roedor luego se acepta como el marco humano para el anticuerpo humanizado. Ver, por ejemplo, Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro método utiliza un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas livianas o pesadas. El mismo marco puede utilizarse 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.

Asimismo, generalmente es conveniente que los anticuerpos se humanicen con la retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. A los fines de lograr este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de secuencias originales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales son comúnmente disponibles y son conocidos para aquellos con experiencia en la técnica. Los programas informáticos están disponibles los cuales ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del rol probable de los residuos en el funcionamiento de secuencia de inmunoglobulina candidata probable, es decir, el análisis de residuos que influencian la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De este modo, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse de las secuencias receptoras y de importación de manera que la característica del anticuerpo deseada, como la mayor afinidad para el o los antígenos blanco se logra. En general, los residuos de región hipervariable son directa y más sustancialmente involucrados en la influencia de unión al antígeno.

Anticuerpos Humanos

Los anticuerpos de la invención pueden construirse mediante la combinación de secuencia(s) de dominio variable del clon Fv seleccionadas de genotecas de expresión en fagos derivados de humanos con secuencia(s) de dominio constante humano, tal como se describió con anterioridad. En forma alternativa, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden realizarse mediante el método de hibridoma. Las líneas celulares de mieloma humano y

heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos han sido descriptos, 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).

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, mediante inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobina endógena. Por ejemplo, se ha descripto que la supresión del homocigo del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea de germen resulta en la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de una matriz del gen de inmunoglobina de línea de germen humano en dichos ratones mutantes de línea de germen resultará en la producción de anticuerpos humanos mediante una prueba de provocación del antígeno. Ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA,* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature,* 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.,* 7: 33 (1993).

El intercambio de genes puede utilizarse para obtener anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedores, donde el anticuerpo humano posee afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano del comienzo. De acuerdo a este método, que también se llama "impresión de epítope" ya sea la región variable de la cadena pesada o liviana de un fragmento de anticuerpo humano que se obtuvo mediante técnicas de expresión de fagos, tal como se describe en el presente, 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 antígenos da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana en donde la cadena humana reestablece el sitio de unión al antígeno que se destruyó por la extracción de la cadena no humana correspondiente en el clon de expresión de fago primario, es decir, el epítope rige (imprime) la elección del compañero de la cadena humana. Cuando se repite el proceso a fin de reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (ver PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de los anticuerpos no humanos mediante el injerto de

HVR, esta técnica ofrece anticuerpos humanos en forma completa, los cuales no poseen residuos de FR o HVR de origen no humano.

Anticuerpos Biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que poseen especificidades de unión para al 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 EGFL7 y la otra es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, el otro antígeno es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), por ejemplo, el epítopo unido mediante los anticuerpos bevacizumab y ranibizumab. En ciertas realizaciones, el anticuerpo biespecífico tiene un primer brazo que comprende las secuencias HVR de un anticuerpo de la invención y un segundo brazo que comprende secuencias de HVR de bevacizumab o ranibizumab. En ciertas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende las secuencias VH y VL de bevacizumab o ranibizumab. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos distintos de EGFL7. Los anticuerpos biespecíficos pueden también utilizarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan EGFL7. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a EGFL7 y un brazo que se une un agente citotóxico, como por ejemplo, saporina, anti-interferon-α, vinca alcaloide, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radioactivo. Los anticuerpos biespecíficos puede preparase como los anticuerpos de extensión completa o fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo.* Anticuerpos específicos $F(ab')_2$).

Los métodos para realizar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobina, en donde las dos cadenas pesadas poseen diferentes especificidades (Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesadas y livianas de inmunoglobina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cales sólo una posee la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante pasos de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Se desarrollan procedimientos similares en

WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.,* 10: 3655 (1991).

De acuerdo a un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) su fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobina, comprende al menos parte de las regiones conectoras CH2 y CH3. En algunas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena liviana se encuentra presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobina y, si se desea, la cadena liviana de inmunoglobina, se introducen en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo huésped idóneo. Esto asegura una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que las proporciones desiguales de las cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción ofrecen rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, introducir las secuencias codificadoras para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales resulta en rendimientos altos o cuando las proporciones no son de una importancia particular.

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobina híbrida (lo que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobina que no deseadas debido a que la presencia de una cadena liviana de inmunoglobina sólo en una mitad de la molécula biespecífica asegura una forma simple de separación. Este enfoque se desarrolla en WO 94/04690. Para más detalles de generación de anticuerpos biespecíficos véase por favor, Suresh *et al., Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo a otro enfoque, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpos puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros recubiertos del cultivo de células recombinantes. La interfase comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante del anticuerpo. En este

método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). En la interfase de la segunda molécula del anticuerpo se crean “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar al de las cadenas laterales grandes mediante el reemplazo de cadenas laterales de aminoácidos grandes por las más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto ofrece un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero por sobre otros productos finales no deseados como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede unirse a la avidina, el otro a la biotina. Se han propuesto, por ejemplo, dichos anticuerpos, para dirigirse a células del sistema inmunológico a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos N.º 4.676.980), y para el tratamiento de la infección del HIV (WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden realizarse mediante la utilización de cualquier método de entrecruzado conveniente. Los agentes de entrecruzado idóneos son muy conocidos en el área y se desarrollan en la Patente de los Estados Unidos Nº 4.676.980, junto con un número de técnicas de entrecruzado.

Las técnicas de generación de anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpos también se han descripto en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse mediante un enlace químico. Brennan *et al., Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el cual los anticuerpos intactos se escinden en forma proteolítica para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en la presencia de la arsenita de sodio del agente complejante de ditiol para estabilizar los ditioles vecinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados luego se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB luego se reconvierte a 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 pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli,* que pueden unirse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al., J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula $F(ab')_2$ del anticuerpo biespecífico humanizado en

forma completa. Cada fragmento Fab' se segregó en por separado del *E. coli* y se los sometió a acoplamiento químico *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de ese modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y células T humanas normales, así como también provocar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra los tumores de mama humanos blanco.

También se han descripto varias técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos en forma directa del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de cierres de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cierres de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región conectora para formar monómeros y luego se re oxidaron para formar heterodímeros del anticuerpo. Este método puede utilizarse también para la producción de homodímeros del anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descripta por Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha ofrecido otro mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) mediante un enlace que es demasiado corto para permitir el pareamiento de dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento están obligados a parearse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento y de ese modo forman dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv) de cadena única. Ver Gruber *et al., J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Anticuerpos Multivalentes

Puede internalizarse (y/o catabolizarse) un anticuerpo multivalente más rápido que un anticuerpo bivalente mediante una célula que exprese un antígeno al cual se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos que los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que

pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifique las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región conectora. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al antígeno amino-terminales a la región Fc. En ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) tres a alrededor de ocho sitios de unión al antígeno. En una realización, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (por ejemplo, dos cadenas de polipéptidos), en donde la/s cadena/s de polipéptidos comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la/s cadena/s de polipéptidos pueden comprender VD1-(X1)n -VD2-(X2)n -Fc, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la/s cadena/s de polipéptidos pueden comprender: -VH-CH1- enlace flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena de VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente puede además comprender al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena liviana. El anticuerpo multivalente del presente puede, por ejemplo, comprender alrededor de dos a ocho polipéptidos de dominio variable de cadena liviana. Los polipéptidos de dominio variable de cadena liviana que se contemplan en el presente comprenden un dominio variable de cadena liviana y, en forma opcional, comprenden además un dominio CL.

Anticuerpos de Dominio Único

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena de polipéptido único que comprende todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de cadena liviana de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de dominio único consiste en todo o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

Variantes de Anticuerpos

En algunas realizaciones, se contemplan modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos que se describen en el presente. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de cambios apropiados en la secuencia nucleótida que codifica al anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de secuencias de amino ácidos del anticuerpo. Toda combinación de supresión, inserción y sustitución puede realizarse para llegar al constructo final, siempre que el constructor final posea las características deseadas. Las alteraciones del aminoácido pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del sujeto en el momento en que se realice la secuencia.

Un método útil de identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se llama "mutagénesis de escaneo de alanina" tal como se describe en Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Aquí, se identifica un residuo o grupo de residuos blanco (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys, y glu) y reemplazados por un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Esas locaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones, luego se refinan mediante la introducción de otras variantes, en o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, mientras que el sitio para introducir un aminoácido está predeterminado, no es necesario determinar la naturaleza de la mutación *per se*. Por ejemplo, para analizar el desempeño de una mutación en un sitio determinado, se realiza la mutagénesis de escaneo de alanina o aleatorio en el codón o región blanco y se monitorean las inmunoglobulinas expresadas para controlar la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de amino ácidos incluyen fusiones de terminales de amino- y/o carboxilo que van en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cientos o más residuos, así como también inserciones de intrasecuencias de residuos de aminoácidos múltiples o únicos. Los ejemplos de inserciones de terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionil de terminal N. Otras variantes insercionales de la molécula del anticuerpo incluyen la

fusión al terminal N o C del anticuerpo a una enzima (*por ejemplo,* para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la media vida del suero del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, se altera un anticuerpo de la invención para aumentar o disminuir el alcance en el que el anticuerpo es glicosilado. La glicosilación de los polipéptidos es tipicamente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a al acoplamiento de una porción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido menos la prolina, son las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento enzimático de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación unida a O se refiere al acoplamiento de azúcares N-aceilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, comúnmente serina o treonina, a pesar de que pueden utilizarse la 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina.

La adición o supresión de sitios de glicosilación al anticuerpo se obtiene convenientemente mediante la alteración de la secuencia del aminoácido de manera que una o más de las secuencias de tripéptidos antes descriptas (para los sitios de glicosilación unidos a N) se crean o remueven. La alteración puede también realizarse mediante la adición, supresión o sustitución de de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilación unidos a O).

En donde el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato que se acople allí puede ser alterado. Los anticuerpos nativos producidos por las células mamíferas, comprenden típicamente un oligosacárido biantenario ramificado que generalmente se acopla mediante un enlace 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, glucosamina N-acetilo (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como también una fucosa acoplada a un GlcNAc en la “raíz” de una estructura de un oligosacáridos biantenario. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención a fin de crear variantes del anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

Por ejemplo, las variantes de anticuerpos se ofrecen si se tiene una estructura de carbohidrato que no posee fucosa acoplada (en forma directa o

indirecta) a una región Fc. Dichas variantes han mejorado la función ADCC. Véase por ejemplo, Publicación de Patente de los Estados Unidos Nros. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones que se refieren a variantes de anticuerpos "defucosilados" o "sin fucosat" 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 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et al*., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares knockout como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8,* células knockout CHO (véase, 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).

Se proveen más variantes de anticuerpos con oligosacáridos divididos en dos, por ejemplo, en los cuales un oligosacárido biantenario acoplado a una región Fc del anticuerpo se encuentra dividido por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden haber reducido la fucosilación y/o mejorado la función ADCC. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); Patente de los Estados Unidos Nº 6.602.684 (Umana *et al.*); y US 2005/0123546 (Umana *et al*.). También se ofrecen las variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido acoplado a una región. Dichas variantes de anticuerpos pueden haber mejorado la función CDC. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran aún más la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos Eu). Dichas sustituciones pueden ocurrir en combinación con cualquiera de las variaciones que se describieron con anterioridad.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, las cuales la hacen un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la media vida del anticuerpo *in vivo* es importante, sin embargo ciertas funciones efectoras (como el complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En ciertas realizaciones, la actividad de Fc del anticuerpo se mide a fin de asegurar que sólo se mantengan las propiedades deseadas. En los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* pueden realizarse para confirmar la reducción/depleción de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión de receptor de Fc (FcR) pueden realizarse para asegurarse de que el anticuerpo no posee habilidad de unión de FcγR (por lo tanto asimismo no poseen actividad ADCC), pero mantiene la habilidad de unión de FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan sólo Fc RIII, mientras que los monocitos expresan FcRI, FcRII y FcRIII. La expresión FcR sobre las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Se describen ejemplos sín límites de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.500.362 (véase por ejemplo Hellstrom, I., et al. *Proc. Nat'l 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 (véase Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). En forma alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y CytoTox 96® ensayo de citotoxicidad no radioactivo (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles incluyen células periféricas mononucleares de sangre (PBMC) y células asesinas naturales (NK). En forma alternativa o, adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, *por ejmplo*, en un modelo animal como el que se desarrolla en Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Los ensayos de unión C1q pueden también realizarse para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemente, se puede llevar a cabo un ensayo CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al*., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y vida media/limpieza mediante los

métodos conocidos en el área (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

También se ofrecen otras variantes de anticuerpos que poseen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de FR. Las sustituciones conservadoras se muestran el la Tabla 1 debajo del encabezado "sustituciones preferidas." Se ofrecen más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla de Sustitución de Aminoácidos, o tal como se describe a continuación en referencia a las clases de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y se pueden monitorear los productos, por ejemplo, para controlar la actividad deseada, como la mejora unión al antígeno, disminución de la inmunogenicidad, ADCC o CDC mejoradas, etc.

TABLA DE SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDOS

Residuo Original	**Sustituciones Ejemplares**	**Sustituciones Preferidas**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	NorleucinA; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo pueden obtenerse mediante la selección de sustituciones que afectan (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una lámina o una conformación de hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio blanco, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo a similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

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

(2) polar sin carga: Gli (G), Ser (S), Tr (T), Cis (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) acídico: Asp (D), Glu (E)

(4) básico: Lys (K), Arg (R), His(H)

En forma alternativa, los residuos que ocurren en forma natural pueden dividirse en grupos basados en propiedades comunes de cadena lateral:

(1) hidrofóbico: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrofílico neutral: Cys, Ser, Tr, Asn, Gln;

(3) acídico: Asp, Glu;

(4) básico: His, Lys, Arg;

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

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservadora o, en los sitios restantes (no conservados).

Un tipo de variante sustitucional implica la sustitución de uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo original (*por ejemplo,* un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para su futuro desarrollo habrán modificado (por

ejemplo, mejorado) las propiedades biológicas relativas al anticuerpo original del cual se han generado. Una variante sustitucional ejemplar es un anticuerpo maduro de afinidad, que puede generarse en forma conveniente mediante técnicas de maduración de afinidad basada en la expresión de fagos. Brevemente, varios sitios de región hipervariable (*por ejemplo,* 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Los anticuerpos que se generan de ese modo se expresan de partículas de fagos filamentosos como fusiones a al menos parte de una proteína de recubrimiento de fagos (por ejemplo, el producto III del gen de M13) empaquetada dentro de cada partícula. Las variantes de expresión de fagos luego se monitorean para corroborar su actividad biológica (*por ejemplo,* la afinidad de unión). A fin de identificar los posibles sitios de región hipervariable para la modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de escaneo (por ejemplo, escaneo de alanina) para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan en forma significativa a la unión al antígeno. En forma alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura de cristal del complejo del antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo a técnicas conocidas en el área, con la inclusión de aquellas que se elaboraran en el presente. Una vez que se generaron dichas variantes, el panel de variantes se somete a monitoreo mediante técnicas conocidas en e área, con la inclusión de las que se describen en el presente, y variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para un futuro desarrollo.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo, se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en el área. Estos métodos incluyen, entre otros, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos que ocurren en forma natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada o (dirigida al sitio) por oligonucleótidos, mutagénesis PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada con anterioridad o una versión sin variante del anticuerpo.

Puede ser conveniente introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpos de la invención, y de ese modo generar una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (*por ejemplo*, una región Fc humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que consista en una modificación de aminoácidos (*por ejemplo* una

sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos con la inclusión de la de la cisteína conectora.

De acuerdo con esta descripción y las prácticas del área, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo de contraparte de tipo salvaje, por ejemplo en la región Fc. Estos anticuerpos, sin embargo, mantendrán sustancialmente las mismas características que se necesitan para la utilidad terapéutica en comparación con su contraparte de tipo salvaje. Por ejemplo, se cree que ciertas alteraciones que pueden realizarse en la región Fc resultarían en la unión de C1q alterada (*es decir.*, que mejoró o disminuyó) y/o la Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en WO99/51642. Véase también Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patente de los Estados Unidos Nº 5.648.260; Patente de los Estados Unidos Nº 5.624.821; y WO94/29351 acerca de otros ejemplos de variantes de la región Fc. WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describe las variantes de anticuerpos con unión mejorada o reducida a FcRs. Véase también, Shields *et al. J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con aumento de medias vidas y una mejora de la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), responsable de la transferencia de los IgGs maternos al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos consisten en una región Fc con una o más sustituciones que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de región Fc alterada y una disminución o aumento de la capacidad de unión de C1q se describen en la Patente de los Estados Unidos Nº 6.194.551B1, WO99/51642. Véase también, Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

En otro aspecto, la invención ofrece anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfase de los polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, en donde las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones consisten en la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, en donde una protuberancia puede colocarse en la protuberancia a fin de promover el complejo del primer y segundo polipéptido Fc. Los métodos de generación de anticuerpos con estas modificaciones se conocen en el área, tal como se los describe en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.731.168.

En otro aspecto, puede ser conveniente crear anticuerpos diseñados con cisteína, por ejemplo, “tioMAbs,” en los cuales uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En realizaciones específicas, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, los grupos de tiol reactivos se posicionan en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo a otras porciones, como porciones de drogas o porciones de drogas de enlace, como se describe en el presente. En ciertas realizaciones, uno o más de los siguientes residuos pueden sustituirse por cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada.

Derivados de Anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse para contener porciones no proteicas conocidas en el área y fácilmente disponibles. En forma preferente, las porciones idóneas para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos sin límites de polímeros solubles en agua incluyen, entre otros, glicol de polietileno (PEG), copolímeros de glicol de etileno/glicol de propileno, carboximetilcelulosa, dextran, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de anhidrido maléico/de etileno, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextran o glicol de poli(n-vinil pirrolidona)polietileno, homopolímeros de glicol de propropileno, óxido de prolipropileno/copolímeros de óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol de polivinil, y sus mezclas. El propionaldehído de glicol de polietileno puede presentar ventajas en la producción debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros acoplados al anticuerpo puede variar, y si se acoplan más de un polímero, pueden ser las mismas o diferentes moléculas. En general, la cantidad y/o tipo de polímeros que se utiliza para la derivatización puede determinarse sobre la base de consideraciones que incluyen, entre otras, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado del anticuerpo se va a utilizar en una terapia con condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proveen los conjugados de un anticuerpo y las porciones no proteicas que pueden calentarse en forma selectiva mediante la exposición a radiación. En una realización, la porción no proteica es un nanotubo

de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede tener cualquier longitud de onda, e incluye, entre otros, longitudes de onda que no dañan las células comunes, pero que calientan la porción no proteica a una temperatura a la cual las células cercanas a la porción no proteica del anticuerpo mueren.

Ensayos de Actividad

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas mediante varios ensayos conocidos en el área.

En un aspecto, los ensayos aseguran la identificación de anticuerpos anti-EGFL7 que poseen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la modulación de uno o más aspectos de los efectos asociados a EGFL7, con la inclusión, entre otros, de unión de EGFL7, protección mediada por EGFL7 de las células endoteliales bajo estrés hipóxico y la habilidad de EGFL7 para mediar la adhesión de células endoteliales.

En ciertas realizaciones de la invención, se analizan las inmunoglobulinas producidas en el presente para corroborar la actividad biológica. En algunas realizaciones, las inmunoglobinas de la presente invención se examinan para corroborar su actividad de unión al antígeno. Los ensayos de unión al antígeno que se conocen en el área y pueden utilizarse en el presente incluyen, entre otros, todo ensayo de unión directo o competitivo que utilice técnicas como western blots, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A. A continuación se provee un ensayo ilustrativo de unión al antígeno en la sección de Ejemplos.

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse mediante una serie de ensayos que incluyen, entre otros, secuencia de terminal N, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de de alta resolución (HPLC) de exclusión del tamaño sin desnaturalización, espectometría masiva, cromatografía de intercambio de iones y digestión de papaína.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla los anticuerpos alterados que poseen algunas pero no todas las funciones efectoras que lo hacen un candidato posible para muchas aplicaciones en las que la media vida del anticuerpo in vivo es importante, sin embrago ciertas funciones efectoras (como el complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En ciertas realizaciones, las

actividades Fc de la inmunoglobina producida se miden para a fin de asegurar que sólo se mantengan las propiedades deseadas. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* pueden realizarse para confirmar la reducción/depleción de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión de receptor de Fc (FcR) pueden realizarse para asegurarse de que el anticuerpo no posee habilidad de unión de FcγR (por lo tanto asimismo no poseen actividad ADCC), pero mantiene la habilidad de unión de FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan Fc□sólo RIII, mientras que los monocitos expresan Fc□RI, Fc□RII y Fc□RIII. La expresión FcR sobre las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Se describe un ejemplo de un ensayo in vitro para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles incluyen células periféricas mononucleares de sangre (PBMC) y células asesinas naturales (NK).

En forma alternativa o, adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejmplo, en un modelo animal como el que se desarrolla en Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Los ensayos de unión C1q pueden también realizarse para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo CDC por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y vida media vida/limpieza mediante los métodos conocidos en el área.

En algunas realizaciones, la invención ofrece anticuerpos alterados que poseen un aumento de las funciones efectoras y/o un incremento de la media vida.

Vectores, Células Madre y Métodos Recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para su clonación (amplificación del ADN) o expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y secuencia fácilmente mediante los procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo). Muchos vectores se encuentran disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que se utilizará. En general, las células huésped preferidas son de origen (generalmente mamífero) procariótico o

eucariótico. Se entenderá que las regiones constantes de cualquier isótopo pueden utilizarse para este propósito, con la inclusión de las regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD, y IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

a. Generación de anticuerpos mediante células procarióticas:

i. Construcción de Vectores

Las secuencias de polinucleótidos que codifican componentes polipéptidos del anticuerpo de la invención pueden obtenerse mediante técnicas recombinantes estándares. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse del anticuerpo que produce las células como las células de hibridoma. En forma alternativa, los polinucleótidos pueden sintetizarse mediante un sintetizador de nucleótidos o técnicas PCR. Una vez que se haya obtenido, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procarióticos. Muchos vectores disponibles y conocidos en el área pueden utilizarse a los fines de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá del tamaño de los ácidos nucleicos que se insertarán en el vector y la célula huésped específica que se transformará con el vector. Cada vector contiene varios componentes, de acuerdo a su función (amplificación o expresión de polinucleótidos heterólogos, o ambas) y su compatibilidad con la célula huésped específica en la cual reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, entre otros: un origen de replicación, un gen marcador de selección, a promotor, un sitio de unión al ribosoma (RBS), una secuencia de señal, la inserción del ácido nucleico homólogo y una secuencia de terminación de transcripción.

En general, los vectores plásmidos que contienen replicón y controlan secuencias que derivan de especies compatibles con la célula huésped se utilizan en conexión con estos huéspedes. El vector comúnmente posee un sitio de replicación así como también secuencias de marcado que son capaces de proveer selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, E. coli generalmente se transforma mediante pBR322, un plásmido que deriva de la especie E. coli. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a la ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por lo tanto ofrece medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados y otros plásmidos microbiales o bacteriófago pueden también contener, o ser modificados para contener

promotores que pueden ser utilizados por el organismo microbial para la expresión de las proteínas endógenas. Los ejemplos de los derivados de pBR322 que se utilizan para la expresión de anticuerpos específicos se describen en detalle en Carter et al., Patente de los Estados Unidos U.S. Nº 5.648.237.

Además, los vectores de fagos que contienen replicón y controlan secuencias que son compatibles con el microorganismo huésped pueden utilizarse como vectores transformantes en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, el bacteriófago como λGEM™-11 puede utilizarse para realizar un vector recombinante que puede utilizarse para transformar células huésped susceptibles como E. coli LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes de polipéptidos. Un promotor es una secuencia reguladora sin traducir ubicada corriente arriba (5') a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos generalmente se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducibles es un promotor que inicia el aumento de niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a los cambios en la condición de cultivo, por ejemplo la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales son muy conocidos. El promotor seleccionado puede unirse en forma operativa a ADN del cistrón que codifica la cadena liviana o pesada mediante la eliminación del promotor del ADN fuente mediante la digestión de la enzima de restricción y la inserción de la secuencia de promotor aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia de promotor nativa como muchos promotores heterólogos pueden utilizarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes blanco. En algunas realizaciones, se utilizan los promotores heterólogos, ya que ellos permiten en general una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen blanco expresado en comparación con el promotor nativo de polipéptido blanco.

Los promotores idóneos para la utilización con huéspedes procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotores de β-galactamasa y lactosa, un sistema de promotores de triptófano (trp) y promotores híbridos como el promotor tac o trc. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacteria (como otros promotores conocidos de fagos o bacteriales) también son idóneos. Sus secuencias nucleótidas se han publicado y de ese modo permitieron

que un experto las uniera en forma operativa a los cistrones que codifican las cadenas livianas y pesadas blanco (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) mediante enlaces o adaptadores para proveer los sitios de restricción necesarios.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia de señal de secreción que dirige la transubicación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente de un vector, o puede ser parte del ADN de polipéptido blanco que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada a los fines de la presente invención debería ser una reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procarióticas que no reconocen y procesan las secuencias de señal nativas de los polipéptidos heterólogos, se sustituye la secuencia de señal por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, de un grupo que consiste en líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp, o enterotoxina estable al calor II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias de señal que se utilizan en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señales STII o variantes de ellas.

En otro aspecto, la producción de inmunoglobinas de acuerdo a la invención puede ocurrir en el citoplasma de la célula huésped, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias de señales de secreción dentro de cada cistrón. En ese aspecto, las cadenas livianas y pesadas de inmunoglobina se expresan, repliegan y ensamblan para formar inmunoglobinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas huéspedes (por ejemplo, las cepas de E. coli trxB-) ofrecen condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces de disulfuro, y de ese modo permiten el replegamiento y ensamble apropiado de las subunidades de proteínas expresadas. Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Las células huésped procarióticas idóneas para la expresión de anticuerpos de la invención incluyen Archaebacteria y Eubacteria, como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen Escherichia (por ejemplo, E. coli), Bacilli (por ejemplo, B. subtilis), Enterobacteria, especies Pseudomonas (por ejemplo, P. aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla, o Paracoccus. En una realización, se utilizan células gram negativas. En una realización se

utilizan células E. coli como huéspedes para la invención. Los ejemplos de cepas de E. coli incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Depósito No. 27.325) y sus derivados, con la inclusión de la cepa 33D3 con el genotipo W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente de los Estados Unidos N.º 5.639.635). Otras cepas y derivados, como E. coli 294 (ATCC® 31.446), E. coli B, E. coliλ 1776 (ATCC® 31.537) y E. coli RV308 (ATCC® 31.608) también son idóneos. Estos ejemplos son de carácter ilustrativo y no limitativo. Los métodos para la construcción de derivados de cualquiera de las bacterias antes mencionadas con los genotipos definidos son conocidos en el área y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Generalmente, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas y tomar en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies de E. coli, Serratia, o Salmonella pueden utilizarse como el huésped cuando los plásmidos conocidos como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 se utilizan para suministrar el replicón. En forma típica, la célula huésped debería segregar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y pueden incorporarse inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo de células.

ii. Producción de Anticuerpos

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión antes mencionados y se cultivan en medios de nutrientes convencionales según corresponda, para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el huésped procariótico de manera que el ADN sea replicable, ya sea como un elemento extracromosomal o por un integrante cromosomal. De acuerdo a las células huésped utilizadas, la transformación se realiza mediante técnicas estándares apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio se utiliza generalmente para las células bacterianas que contienen barreras de paredes celulares sustanciales. Otro método de transformación emplea glicol de polietileno/DMSO. Otra técnica que se utiliza es la electroporación.

Las células procarióticas utilizadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en el área e idóneos para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios idóneos incluyen extracto de luria (LB) más los complementos nutrientes necesarios. En algunas

realizaciones, los medios también contienen un agente de selección, elegido en base a la construcción del vector de expresión, para permitir en forma selectiva el crecimiento de las células procarióticas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se agrega ampicilina al medio para el crecimiento de las células que expresan el gen resistente a la ampicilina.

Todos los complementos necesarios además del carbono, nitrógeno, y Fuentes de fosfato inorgánico pueden incluirse como concentraciones apropiadas que se introducen solas o como una mezcla con otro complemento o medio como una fuente de nitrógeno compleja. En forma opcional, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que contiene glutationa, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

Las células huésped procarióticas se cultivan a temperaturas apropiadas. Para el cultivo de E. coli, por ejemplo, la temperatura preferida va desde alrededor de 20°C a 39°C aproximadamente, más preferentemente alrededor de 25°C a 37°C, aún más preferentemente a alrededor de 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH desde 5 a alrededor de 9, de acuerdo al organismo huésped principalmente. Para E. coli, el pH es preferentemente alrededor de 6,8 a 7,4, y más preferentemente alrededor de 7,0.

Si un promotor inducible se utiliza en el vector de expresión de la invención, se induce la expresión de la proteína bajo condiciones idóneas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se utilizan para la transcripción controlante de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante del fosfato para la inducción. En forma preferente, el medio limitante del fosfato es el medio C.R.A.P (véase por ejemplo, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Una variedad de otros inductores puede utilizarse, de acuerdo al constructo de vector utilizado, como se conoce en el arte.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se segregan y recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas implica la disrupción del microorganismo, generalmente mediante medios como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que se altera a las células los restos de las células o las células completas pueden removerse mediante centrifugación o filtración. Se pueden purificar las proteínas nuevamente, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad. Alternativamente, se puede transportar a las proteínas en el medio de cultivo y aislarlo allí. Se puede

remover las células del cultivo y filtrar y concentrar las partículas flotantes del cultivo para la purificación de las proteínas producidas. Se puede aislar e identificar a los polipéptidos expresados mediante los métodos comúnmente conocidos como la electroforesis de gel poliacrilamida (PAGE) y el ensayo de Western blot.

En otro aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se realice en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Varios procedimientos de fermentación por lotes alimentados a gran escala se encuentran disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala poseen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente alrededor de 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan impulsores de agitación para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente la glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros en capacidad volumétrica, y puede variar de 1 litro a 100 litros aproximadamente.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteína se inicia en forma típica luego de que se cultivó a las células bajo las condiciones apropiadas a una densidad deseada, por ejemplo, una OD550 de alrededor de 180-220, en cuya etapa las células se encuentran en la fase estacionaria temprana. Una variedad de inductores puede utilizarse de acuerdo al constructo de vector empleado, como se conoce en el área y se describió con anterioridad. Se puede cultivar a las células por períodos menores en forma previa a la inducción. Las células se inducen generalmente por alrededor de 12-50 horas, a pesar de que puede utilizarse un tiempo de inducción mayor o menor.

Para mejorar el rendimiento de la producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, se pueden modificar varias condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblado adecuado y repliego de los polipéptidos del anticuerpo segregados, pueden utilizarse vectores adicionales que sobreexpresen proteínas de chaperona, como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y o DsbG) o FkpA (una isomerasa peptidilprolil cis, trans con actividad chaperona) para co-transformar las células procarióticas huésped. Las proteínas de chaperona han demostrado facilitar el correcto repliego y solubilidad de las proteínas heterólogas producidas en las células huésped bacterianas. Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou et al., Patente de los Estados Unidos Nº

6.083.715; Georgiou et al., Patente de los Estados Unidos Nº 6.027.888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son sensibles en términos proteolíticos), pueden utilizarse ciertas cepas huésped deficientes para las enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar la mutación genética en los genes que codifican las proteasas bacterianas conocidas como la Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y sus combinaciones. Algunas cepas de E. coli deficientes de proteasa se encuentran disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), supra; Georgiou et al., Patente de los Estados Unidos N.º 5.264.365; Georgiou et al., Patente de los Estados Unidos Nº 5.508.192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

En una realización, las cepas de E. coli deficientes para las enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas de chaperona se utilizan como células huésped en el sistema de expresión de la invención.

iii. purificación de los Anticuerpos

Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas estándares conocidos en el área. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación apropiados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio de iones, precipitación de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en sílice o una resina de intercambio de cationes como DEAE, *chromatofocusin*g, SDS-PAGE, precipitación de sulfato de amonio, y filtración de gel con, por ejemplo, Sephadex® G-75.

En un aspecto, la Proteína A inmovilizada en una fase sólida se utiliza para la purificación de inmunoafinidad de los productos del anticuerpo de extensión completa de la invención. Las proteína A es una proteína de pared celular 41kD de Staphylococcus aureas que se une con una alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. la fase sólida a la cual la proteína A se inmoviliza es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado more o una columna de ácido silícico. En algunas realizaciones, la

columna se recubierto con un reactivo como glicerol, en un intento por prevenir la adhesión no específica de contaminantes.

Como primer paso de la purificación, se aplica la preparación que deriva del cultivo de las células tal como se describe con anterioridad en la fase sólida de la Proteína A inmovilizada para permitir la unión del anticuerpo de interés a la proteína A. la base sólida luego se lava para remover los contaminantes unidos en forma no específica a la fase sólida. Finalmente se recupera el anticuerpo de interés de la fase sólida mediante elusión.

b. Generación de anticuerpos mediante células huésped eucarióticas:

Los componentes del vector generalmente incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de réplica, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción.

(i) Componente de secuencia de señal

Un vector para la utilización en una célula huésped eucariótica puede también contener una secuencia de señal u otro polipéptido que posea un sitio de escisión específico en el N-término de la proteína madura o el polipéptido de interés. La secuencia de señal heteróloga es preferentemente aquella que la célula huésped reconoce y procesa (es decir, la que una peptidasa señal escinde). En la expresión celular en mamíferos, las secuencias de señal de los mamíferos así como los líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD simplex del herpes, se encuentran disponibles.

El ADN para dicha región precursora, se encuentra ligado en un marco de lectura al ADN que codifica al anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

Generalmente, no se necesita un origen de un componente de replicación para los vectores de expresión de los mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 puede utilizarse en forma típica sólo debido a que contiene al promotor temprano.

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de clonación y expresión pueden contener un gen de selección, también calificado como un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias autotróficas, en donde sea relevante, o (c) proveen nutrientes importantes que no se encuentran disponibles en los medios complejos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza una droga para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transformaron en forma exitosa con un gen heterólogo, producen una proteína que otorga resistencia a la droga y, por lo tanto, sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante utilizan neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables apropiados para las células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para tomar el ácido nucleico del anticuerpo, como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR primero se identifican mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea el DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC® CRL-9096).

En forma alternativa, las células huésped (en particular los huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, una proteína de DHFR de tipo salvaje anticuerpo, y otro marcador seleccionable como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante el cultivo celular en un medio que contiene una selección un agente de selección para el marcador seleccionable como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase Patente de los Estados Unidos Nº 4,965,199.

(iv) Componente de Promotor

Los vectores de clonación y expresión usualmente contienen un promotor que reconoce el organismo huésped y se encuentra unido en forma operacional al ácido nucleico del polipéptido del anticuerpo. Las secuencias de promotor son conocidas como eucariotas. Virtualmente todos los genes eucarióticos poseen una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases corriente arriba desde el sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra de 70 a 80 bases corriente arriba desde el comienzo de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT (SEC ID Nº: 232) donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos se encuentra

una secuencia AATAAA (SEC ID Nº: 233) que puede ser una señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias están correctamente insertadas en vectores de expresión eucarióticos.

La transcripción del polipéptido del anticuerpo desde los vectores en las células huésped de mamíferos es controlada, por ejemplo, por promotores que se obtienen de los genomas de virus como el virus polioma, el fowlpox virus, adenovirus (como el Adenovirus 2), virus del pailoma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y Virus del Simio 40 (SV40), de los promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor actin o un promotor de inmunoglobina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción del SV40 que también contiene el origen viral del SV40 de replicación. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción del HindIII E. Un sistema para expresar el ADN en los huéspedes de mamíferos mediante la utilización del virus del papiloma bovino como un vector se desarrolla en la Patente de los Estados Unidos Nº 4.419.446. Se describe una modificación de ese sistema en la Patente de los Estados Unidos Nº 4.601.978. En forma alternativa, puede utilizarse la repetición de terminal largo del Virus de Sarcoma de Rous como el promotor.

(v) Componente de elemento potenciador

La transcripción del ADN que codifica el polipéptido del anticuerpo de la presente invención por medio de eucariotas más elevados, se aumenta a menudo mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras son conocidas de genes de mamíferos (globina, elastasa, albumina, α-fetoproteina, e insulina). En forma típica, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariótica. Los ejemplos incluyen un potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación, y los potenciadores del adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre la potencialización de elementos para la activación de los promotores eucarióticos. El potenciador puede unirse al vector en una posición 5' o 3' a la secuencia de

codificación del polipéptido del anticuerpo, pero se ubica en forma preferente en un sitio 5' del promotor.

(vi) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas también contendrán, en forma típica, secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias se encuentran comúnmente disponibles en las regiones no traducidas 5' y, en ocasiones 3', de los ADNs o ADNcs virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos nucleótidos que se transcriben como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de cultivo bovina. Véase WO94/11026 y el vector de expresión que allí se desarrolla.

(vii) Selección y transformación de las células huésped

Las células huésped apropiadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente incluyen células eucariotas superiores que se describen en el presente, incluyendo las células huésped vertebradas. La propagación de las células vertebradas en cultivo (cultivo de tejido) se ha vuelto un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC® CRL 1651); línea de riñón embriónica humana (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en el cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC® CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células sértoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC® CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC® CRL-1587); células de carcinoma cervical humanas (HELA, ATCC® CCL 2); células de riñón caninas (MDCK, ATCC® CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC® CRL 1442); células de pulmón humanas (W138, ATCC® CCL 75); células de hígado humanas (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 línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de clonación o expresión antes mencionados para la producción de anticuerpos y se cultivan en

medios nutrientes convencionales modificados según corresponda para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de células huésped

Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios disponibles en los comercios como *Ham's F10* (Sigma), *Minimal Essential Medium* ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* ((DMEM), Sigma) son apropiados para el cultivo de células huésped. Además, cualquier de los medios descriptos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980), Patente de los Estados Unidos Nros. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de los Estados Unidos Re. 30,985 pueden utilizarse como medios de cultivo para las células huésped. Cualquier de estos medios pueden complementarse, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidermal), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), buffers (como el HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como la droga GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos que generalmente se encuentran en las concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Pueden incluirse otros complementos necesarios en concentraciones apropiadas conocidas por aquellos especialistas del área. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, pH, y similares, son aquellas que se utilizaron previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán aparentes para los expertos habituales.

(ix) Purificación del anticuerpo

Al utilizar técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse en forma intracelular, o segregarse directamente en el medio. Si se produce el anticuerpo en forma intracelular, como primer paso, se remueven los restos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. En donde se segrega el anticuerpo en el medio, generalmente primero se concentran partículas flotantes de dichos sistemas de expresión mediante la utilización de un filtro de concentración de proteínas disponible en los comercios, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración de Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de la proteasa como el PMSF puede incluirse en cualquiera

de los pasos anteriores para la proteolisis y pueden incluirse antibióticos a fin de prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición del anticuerpo preparada de las células puede purificarse mediante la utilización de, por ejemplo, cromatografía hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de todo dominio Fc de inmunoglobina presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos basados en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Se recomienda la Proteína G para todos los isotipos de ratones y para el $\gamma 3$ humano (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es agarosa en la mayoría de los casos, pero otras matrices se encuentran disponibles. Las matrices estables en forma mecánica como el vidrio de poro controlado o el poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempo de procesamiento menores que los que pueden obtenerse con la agarosa. En donde el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas como el fraccionamiento en una columna de intercambio de iones, la precipitación de etanol, HPLC de Fase Reversa, cromatografía en sílica, cromatografía de heparina SEPHAROSE™, cromatografía en resina de intercambio de anión o catión (como una columna de ácido poliaspártico), *chromatofocusing*, SDS-PAGE, y la precipitación de sulfato de amonio también se encuentran disponibles en función del anticuerpo a recuperar.

Luego de cualquier paso de purificación preliminar, se puede someter a la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes a cromatografía de interacción hidrofóbica de bajo pH mediante un buffer de elusión a un pH entre 2,5-4,5 aproximadamente, preferentemente realizada a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, de 0-0.25M de sal).

Inmunoconjugados

La invención también provee inmunoconjugados (a los cual se hace referencia en forma intercambiable como conjugados “anticuerpo-droga”, o “ADCs”) que consisten en un anticuerpo conjugado a uno o más agentes citotóxicos, como un agente quimioterapéutico, una droga, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina de proteína, una toxina activa por

acción enzimática de origen bacteriano, fúngido, vegetal o animal o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo (es decir, a radioconjugado).

Los inmunoconjugados se han utilizado para la entrega loca de agentes citotóxicos, es decir, drogas que matan o inhiben el crecimiento o proliferación de células en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549; Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) i 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172; Patente de los Estados Unidos Nº 4.975.278). Los inmunoconjugados permiten le entrega dirigida de una porción de droga a un tumor y su acumulación intracelular allí, en donde la administración sistémica de drogas no conjugadas puede resultar en niveles de toxicidad inaceptables para las células normales así como también las células tumorales que se desea 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 Antibodi*es '*84: Biological And Clinical Applications* (A. Pinchera et al., eds) Págs. 475-506. Se ha informado que tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87). Las drogas que se utilizan en estos métodos incluyen la daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., (1986) *supra*). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen las toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas vegetales como la ricina, toxinas de moléculas pequeñas como la 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 emplear sus efectos citotóxicos mediante mecanismos que incluyen la unión a la tubulina, unión al ADN o inhibición de la topoisomerasa. Algunas drogas citotóxicas tienden a ser inactivas o menos activas cuando se las conjuga a grandes anticuerpos o ligandos receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjuagdo anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 de murina dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B

normales y malignos y radioisótopos 111In o 90Y unidos por un quelante de enlace 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). A pesar de que ZEVALIN posee actividad contra el Linfoma no Hodgkin (NHL) de células B, la administración resulta en citopenias severas y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo-droga compuesto de un anticuerpo huCD33 unido a la caliqueamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; Patente de los Estados Unidos Nros. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado anticuerpo-droga compuesto del anticuerpo huC242 unido mediante el enlace de disulfuro SPP a la porción de droga de maitansinoide, DM1, está avanzando en los ensayos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, como el cáncer de colon, pancreático, gástrico y otros cánceres. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado anticuerpo-droga compuesto del anticuerpo monoclonal del antígeno de membrana específico prostático (PSMA) unido a la porción de droga del maitansinoide, DM1, se encuentra en desarrollo para el posible tratamiento de los tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y sobre carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 sobre tumores hematológicos) (Doronina et al (2003) *Nature Biotechnol.* 21(7):778-784) y se encuentran en desarrollo terapéutico.

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 en el presente (por ejemplo, arriba). Las toxinas activas por acción enzimática y sus fragmentos que pueden utilizarse incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos sin unión de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de Pseudomonas aeruginosa), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteína americana Pitolaca (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y

los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Se encuentra disponible una variedad de de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, y ^{186}Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se realizan mediante la utilización de una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados funcionales de imidoésteres (como el dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como disuccinimidil suberato), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina),derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de fluorina bis-activa (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido triaminpentaacético 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno rotulado Carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de un agente quelante para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase WO94/11026.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, como la caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, a tricoteceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que poseen actividad de toxina, también se contemplan en el presente.

Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de extensión completa o fragmentos) conjugado a una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina. La maitansina se asiló por primera vez del arbusto Maytenus serrata del este de África (Patente de los Estados Unidos Nº 3.896.111). Luego, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, como el maitansinol y los ésteres de maitansinol C-3 (Patente de los Estados Unidos Nº 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se desarrollan, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 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.

Las porciones de droga de maitansinoides son porciones de droga atractivas en los conjugados de drogas debido a que son: (i) relativamente accesibles para prepararlas mediante fermentación o modificación química, derivatización de los productos de fermentación, (ii) susceptibles a la derivatización con grupos funcionales para la conjugación a través de enlaces sin disulfuro a los anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) efectivas contra una variedad de líneas celulares de tumores.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para realizarlos y su uso terapéutico se desarrollan en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.208.020, 5.416.064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describió inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para las células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumor in vivo. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describe inmunoconjugados en los cuales un maitansinoide se conjugó mediante un enlace de disulfuro a un anticuerpo de murina A7 unido a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal de murina TA.1 que se une al oncogen HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se examinó in vitro en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, que expresa 3 x 105 HER-2 antígenos de superficie por célula. El conjugado de droga obtuvo un nivel de citotoxicidad similar a la droga de maitansinoide libre, el cual podría incrementarse mediante el aumento de la cantidad de moléculas de maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin diminuir en forma significativa la actividad biológica de la molécula del anticuerpo o la molécula del maitansinoide. Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nº 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoides conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia al mejorar la citotoxicidad de las células blanco sin afectar en forma negativa la función o soludibilidad del anticuerpo, a pesar de que se esperará que incluso una molécula de toxina/anticuerpo mejore la citotoxicidad sobre el uso de un anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy

conocidos en el área y se los puede sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislar de fuentes naturales. Los maitansinoides idóneos se desarrollan por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no patentadas a las que se hizo referencia en el presente con anterioridad. Los maitansinoides preferidos son el maitansinol y análogos del maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, como varios ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de unión conocidos en el área para realizar conjugados anticuerpo-maitansinoide, con la inclusión de, por ejemplo, aquellos que de desarrollan en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.208.020 o la Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 10/960,602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el SMCC del componente de unión pueden prepararse tal como se desarrolla en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 10/960,602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de unión incluyen grupos de disulfuro, grupos de tioeter, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a la peptidasa, o grupos lábiles a la esterasa, tal como se desarrolla en las patentes que se identifican con anterioridad, y se prefieren los grupos de disulfuro y tioeter. En el presente se describen y ejemplifican grupos de unión adicionales.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden realizarse mediante la utilización de una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como disuccinimidil suberato), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocinatos (como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activo (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de unión que se prefieren en particular 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 asegurar la unión de disulfuro.

El enlace puede acoplarse a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, de acuerdo al tipo de unión. Por ejemplo, un enlace de éster puede

formarse mediante la reacción con un grupo de hidroxilo con técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 con un grupo de hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo de hidroxilo, y la posición C-20 con un grupo de hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo del maitansinol.

Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a dolastinas o análogos y derivados peptídicos de dolastina, las auristatinas (Patente de los Estados Unidos N.º 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastinas y auristatinas interfieren con la dinámica de mircrotúbulos, hidrólisis GTP, y división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y poseen actividad anticancer (US 5663149) y antifúngida (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). La porción de droga de dolastina o auristatina puede acoplarse al anticuerpo a través de terminales N (amino) o el terminal C (carboxil) de la porción de droga peptídica (WO 02/088172).

Los ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen las porciones de droga de monometilaristatina unidas al terminal N DE y DF, que se desarrollan en “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, Serie de los Estados Unidos Nº 10/983,340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

En forma típica, los porciones de droga en base a péptidos pueden prepares mediante la formación de una unión de péptido entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Dichas uniones de péptidos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo al método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder and K. Lübke, “The Peptides”, volumen 1, Págs. 76-136, 1965, Academic Press) el cual es muy conocido en el área de la química de péptidos. Las porciones de droga de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo a los métodos de: US 5635483; US 5780588; 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. Véase también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, Serie de los Estados Unidos Nº 10/983,340, presentada el 5 de noviembre de 2004 (que

desarrolla por ejemplo, enlaces y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina como MMAE y MMAF conjugados a enlaces).

Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir rupturas de ADN de doble cadena en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véase patentes de los Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas para American Cyanamid Company). Los análogos estructurales que pueden utilizarse incluyen, entre otros γ1I, α2I, α3I, N-acetyl-γ1I, PSAG y θI1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de los Estados Unidos antes mencionadas para American Cyanamid). Otra droga anti tumoral a la que se puede conjugar el anticuerpo es QFA, la cual es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA poseen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por el anticuerpo mejora enormemente los efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse a los anticuerpos BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracil, la familia de agentes conocida en forma colectiva como complejo LL-E33288 descripta en las patentes de los Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como también esperamicinas (patente de los Estados Unidos 5.877.296).

Las toxinas activas por acción enzimática y sus fragmentos que pueden utilizarse en la cadena A de difteria, los fragmentos activos sin unión de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de Pseudomonas aeruginosa), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomcina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente de invención además contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN como una deoxiribonucleasa; DNase).

Para destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Se encuentra disponible una variedad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para los estudios escintigráficos, por ejemplo tc99m o I123, o un rotulo spin para la imagen de resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como imagen de resonancia magnética, mri), como iodina-123 nuevamente, iodina-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganesa o hierro.

El radio- u otros rótulos pueden incorporarse en el conjugado en formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis de aminoácido química con precursores de aminoácidos idóneos que comprenden, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los rótulos como $tc^{99}m$ o I^{123}, Re^{186}, Re^{188} y In^{111} pueden acoplarse mediante un residuo de cisteína en el péptido. Yttrium-90 puede acoplarse mediante un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede utilizarse para incorporar iodina-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal,CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico pueden realizarse mediante la utilización de una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como disuccinimidil suberato), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio(como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activo (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina can tal como se describe en Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). El ácido triaminpentaacético 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno rotulado Carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de un agente quelante para la conjugación del

radionucleótido al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlace puede ser un “enlace escindible” que facilita el liberación de la droga citotóxica en a célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlace lábil al ácido, un enlace sensible a la peptidasa, un enlace fotolábil, en enlace de dimetil o un enlace que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos Nº 5.208.020).

Los compuestos contemplan en forma expresa, entre otros, ADC preparado con reactivos de enlaces cruzados: 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 se encuentran disponibles en los comercios (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Véase páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados anticuerpo-droga

En los conjugados de anticuerpo-droga (ADC), se conjuga un anticuerpo (Ab) a una o más porciones de droga (D), por ejemplo, alrededor de 1 a 20 porciones de droga por anticuerpo, a través de un enlace (L). El ADC de Formula I puede prepararse a través de diferentes vías, mediante el empleo de reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por los expertos en el área, con la inclusión de: (1) reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo de enlace bivalente, para formar Ab-L, mediante una unión covalente, seguido de una reacción con una porción de droga D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico con un reactivo de enlace bivalente, para formar D-L, mediante unión covalente, seguido de una reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. En el presente se describen métodos adicionales para la preparación de ADC.

$Ab–(L–D)_p$ I

El enlace puede estar compuesto de uno o más componentes de unión. Los ejemplos de componentes de enlace incluyen 6-maleimidocaproil (“MC”), maleimidopropanoil (“MP”), valina-citrulina (“val-cit”), alanina-fenilalanina (“ala-phe”), p-aminobenziloxicarbonilo (“PAB”), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (“SPP”), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (“SMCC’), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (“SIAB”). Se conocen en el área componentes de enlace adicionales y algunos se describen en el presente. Véase también “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, Serie de los Estados Unidos N.º 10/983,340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

En algunas de las realizaciones, el enlace puede comprender residuos de aminoácidos. Los ejemplos de componentes de enlace de aminoácidos incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los ejemplos de dipéptidos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-fe). Los ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina-valina-citrulina (gli-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gli-gli-gli). Los residuos de aminoácidos comprenden un componente de enlace incluyen aquellos que ocurren en forma natural, así como también aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que no ocurren en forma natural, como la citrulina. Los componentes de enlace de aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, entre otros: (i) grupos de amina de N- terminal, (ii) grupos de amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos de tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos de aminos e hidroxil de azúcar en donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos de amina, tiol e hidroxil son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar uniones covalentes con grupos electrofílicos en porciones de enlace y reactivos de enlace, con la inclusión de: (i) ésteres activos como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y hálidos ácidos; (ii) hálidos de alquil y benzil como haloacetamidas; (iii) grupos de aldehídos, cetonas, carboxil y maleimida. Ciertos anticuerpos poseen disulfuros de intercadena reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con otros reactivos de enlace mediante el tratamiento con un agente reductor DTT (ditiotreitol). Cada puente de cisteína por lo tanto, formará, en teoría, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleofílicos adicionales en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) lo cual resulta en la conversión de una amina en un tiol. Los grupos de tiol reactivos pueden introducirse en un anticuerpo (o fragmentos del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, la preparación de anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo-droga pueden producirse mediante la modificación del anticuerpo para introducir porciones electrofílicas que pueden reaccionar con sustitutos nucleofílicos en el reactivo de enlace o droga. Las

azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de periodato, para formar grupos de aldehídos o cetonas que pueden reaccionar con el grupo de amina de los reactivos de enlace o porciones de droga. Los grupos de base Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable o pueden reducirse, por ejemplo, mediante reactivos de borohídridos para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de carbohidrato del anticuerpo glicosilado con glactosa oxidasa o meta-periodato de sodio puede dar grupos de carbonilo (aldehído o cetona) en la proteína que puede reaccionar con los grupos apropiados en la droga (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con meta-periodato de sodio, lo cual resulta en la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Se puede hacer reaccionar dicho aldehído puede con una porción de droga o un nucleófilo de enlace.

Asimismo, los grupos nucleofílicos en una porción de droga incluyen, entre otros: grupos de amina, tiol, hidroxil, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carxilato de hidrazina, y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar uniones covalentes con grupos electrofílicos en porciones de enlace y reactivos de enlace que incluyen: (i) ésteres activos como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y ácidos de haluros ; (ii) grupos de haluros de alquilo y bencilo como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxil, y maleimida.

En forma alternativa, puede realizarse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptido. La extensión del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican dos porciones del conjugado ya sea adyacentes o separadas por una región que codifica un péptido de enlace que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (como la estreptavidina) para la utilización en la pre-selección del tumor en donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la extracción del conjugado no unido de la circulación mediante un agente de limpieza y luego la administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para el almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo que posee el nivel de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales aceptables en términos fisiológicos (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th edición (2000)), en la forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen buffers como el fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; conservadores (como el cloruro de amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol de fenol, butil o bencilo; alquil parabenos como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 residuos aproximadamente); proteínas, como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como la polivinilpirrolidona; aminoácidos como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen la glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como la sucarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra iones formadores de sal como el sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ y glicol de polietileno (PEG).

La formulación del presente puede también contener más de un compuesto activo, tal como sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan en forma adversa. Dichas moléculas se encuentran presentes en combinación, en forma adecuada, en cantidades que son efectivas para el propósito deseado.

Los ingredientes activos pueden capturarse en micro cápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, sistema de entrega de drogas coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desarrollan en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition (2000).

Las formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se obtiene fácilmente mediante la filtración a través de las membranas de filtración estériles.

Pueden realizarse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos idóneos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la inmunoglobina de la invención, cuyas matrices se encuentran en forma de artículos formados, *por ejemplo,* films, o microcápsula. Los ejemplos de las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidos (Patente de los Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de vinilo-etileno no degradable, copolímeros de ácido láctido-ácido glicólico degradable como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros como el acetato de vinilo-etileno y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas por más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo por un largo período de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como un resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo cual resulta en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la imnunogenicidad. Las estrategias racionales pueden diseñarse para la estabilización, de acuerdo al mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de adición es una formación de unión S-S- intermolecular a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede obtenerse mediante la modificación de los residuos de sulfidrilo, la liofilización de soluciones acídicas, el control del contenido de humedad, la utilización de aditivos apropiados, y el desarrollo de composiciones específicas de matriz de polímero.

Usos

Puede utilizarse un anticuerpo de la presente invención en, por ejemplo, métodos terapéuticos *in vitro, ex vivo* e *in vivo*.

La invención provee métodos y composiciones útiles para modular los estados de la enfermedad con la expresión y/o actividad de EGFL7, como el aumento de la expresión y/o actividad o una expresión y/o actividad indeseada.

Dichos métodos consisten en la administración de una dosis efectiva del anticuerpo anti-EGFL7 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención ofrece métodos para el tratamiento o prevención de un tumor, cáncer y/o un desorden proliferativo de células. Los métodos consisten en la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-EGFL7 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención ofrece métodos para la inhibición de la angiogénesis. Los métodos consisten en la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-EGFL7 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención ofrece métodos para mejorar la eficacia de otro agente anti-angiogénico. Los métodos consisten en la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-EGFL7 a un individuo que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, un individuo tiene un tumor, cáncer y/o desorden proliferativo de células. En algunas realizaciones, el otro agente anti-angiogénicos se dirige a VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF.

Se entiende que todo anticuerpo anti-EGFL7 idóneo que se utiliza en los métodos de tratamiento, con la inclusión de los anticuerpos monoclonales y policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo maduro de afinidad, un anticuerpo humanizado, y/o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, se utiliza cualquier anticuerpo anti-EGFL7 que se describe en el presente para el tratamiento.

En cualquier de los métodos del presente, se puede administrar al sujeto o paciente junto con el anticuerpo del presente, una cantidad efectiva de un segundo medicamento (cuando el anticuerpo del presente es un primer medicamento), que es otro agente activo que puede tratar la condición en el sujeto que necesita el tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede co-administrarse con otro anticuerpo, agente/s quimioterapéutico/s (con la inclusión de cócteles de agentes quimioterapéuticos), agente/s anti-angiogénico/s, agente/s inmunosupresor/es, citosina/s, antagonista/s de la citosina, y/o agente/s inhibidores del crecimiento. El tipo de dicho segundo medicamento depende de varios factores, con la inclusión del tipo de desorden, la severidad de la enfermedad, la condición y edad del paciente, el tipo y dosis del primer medicamento que se emplee, etc.

Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento tumoral, por ejemplo, puede ser conveniente combinarlo con uno o más agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento tumoral. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede combinarse con el agente anti-angiogénico, como un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN®) y/o anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo anticuerpo trastuzumab anti-HER2 HERCEPTIN® o un anticuerpo anti-HER2 que se une al Dominio II de HER2, como el anticuerpo anti-HER2 pertuzumab OMNITARG™) en un esquema de tratamiento, por ejemplo, al tratar cualquiera de las enfermedades que se describen en el presente, con la inclusión de cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer mama y/o cáncer pancreático. En algunos casos, las combinaciones anteriores pueden lograrse utilizando un anticuerpo biespecífico. En forma alternativa, o adicionalmente, el paciente puede recibir una terapia de radiación combinada (por ejemplo, irradiación de rayos externa o terapia con un agente rotulado radioactivo, como un anticuerpo). Las terapias combinas que se nombraron con anterioridad incluyen la administración combinada (en donde dos o más agentes se incluyen en las mismas formulaciones o formulaciones separadas), y la administración por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir en forma previa, y/o luego de la administración de la terapia o terapias adjuntas. Además, se espera que la combinación de un anticuerpo de la presente invención con un agente relativamente no citotóxico como otra molécula biológica, por ejemplo, otro anticuerpo reduzca la citotoxicidad versus la combinación del anticuerpo con un agente quimioterapéutico de otro agente que es altamente tóxico para las células.

El tratamiento con una combinación del anticuerpo del presente con uno o más segundos medicamentos resulta preferentemente en una mejora de los signos o síntomas del cáncer. Por ejemplo, dicha terapia puede resultar en una mejora en la supervivencia (supervivencia total y/o supervivencia de progresión libre) relativa al paciente tratado sólo con un segundo medicamento (por ejemplo, sólo un agente quimioterapéutico), y/o puede resultar en una respuesta objetiva *(parcial o completa, preferentemente completa). Además, el tratamiento con la combinación de un anticuerpo del presente y uno o más segundos medicamentos, resulta preferentemente en un aditivo, y más preferentemente en un beneficio sinergístico (o más que aditivo), terapéutico para el paciente. Preferentemente, en este método de combinación el tiempo entre al menos una administración del

segundo medicamento y al menos una administración del anticuerpo del presente es de alrededor de un mes o menos, más preferentemente, alrededor de dos semanas o menos.

Para el tratamiento de cánceres, el segundo medicamento es preferentemente otro anticuerpo, agente quimioterapéutico (con la inclusión de cócteles de agentes quimioterapéuticos), agentes anti-angiogénicos, agente inmunosupresor, profármaco, citosina, antagonista de la citoquina, radioterapia citotóxica, corticosteroide, vacuna contra el cáncer anti-emética, agente analgésico anti-vascular, y/o agente inhibidor del crecimiento. El agente citotóxico incluye un agente que interactúa con el ADN, los antimetabolitos, los inhibidores de la topoisomerasa I o II, o el inhibidor del huso o agentes estabilizadores (por ejemplo, preferentemente vinca alcaloide, más preferentemente seleccionado de la vinblastina, deoxivinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vinepidina, vinfosiltina, vinzolidina y vinfunina), o cualquier agente que se utilice en quimioterapia como 5-FU, un taxano, doxorubicina, o dexametasona.

En algunas realizaciones, el segundo medicamento es otro anticuerpo utilizado para tratar cánceres como aquellos que se dirigen contra el dominio extracelular del receptor de HER2/neu, por ejemplo, trastuzumab, o uno de sus fragmentos funcionales, el inhibidor de pan-HER, un inhibidor de Src, un inhibidor de MEK, o un inhibidor de EGFR (por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFR (como uno que inhiba la actividad tirosina quinasa de EGFR), el cual es preferentemente el anticuerpo monoclonal de ratón 225, su derivado quimérico de ratón-hombre C225, o un anticuerpo humanizado que deriva de este anticuerpo 225 o agentes naturales derivados, dianilinoftalimidas, pirazolo- o pirrolopiridoprimidinas, quinazilinas, gefitinib, erlotinib, cetuximab, ABX-EFG, canertinib, EKB-569 y PKI-166), o inhibidor de dual-EGFR/HER-2 como lapatanib. Los segundos medicamentos adicionales incluyen alemtuzumab (CAMPATH™), FavID (IDKLH), anticuerpos CD20 con glicosilación alterada, como GA-101/GLYCART™, oblimersen (GENASENSE™), talidomida y sus análogos, como lenalidomida (REVLIMID™), imatinib, sorafenib, ofatumumab (HUMAX-CD20™), anticuerpo anti-CD40, por ejemplo SGN-40, y anticuerpo anti-CD-80, por ejemplo galiximab.

El agente anti-emético es preferentemente hidrocloruro de ondansetrón, hidrocloruro de granisetrón, metroclopramida, domperidona, haloperidol, ciclizina, lorazepam, proclorperazina, dexametasona, levomepromazina, o tropisetrón. La vacuna es preferentemente GM-CSF ADN y vacunas a base de células, vacuna de

células dendríticas, vacunas virales recombinantes, vacunas de proteínas de choque térmico (HSP), vacunas alogénicas o autólogas contra tumores. El agente analgésico es preferentemente el ibuprofeno, naxopreno, trisalicilato de magnesio de colina, o hidrocloruro de oxicodona. El agente anti-vascular es preferentemente bevacizumab, o rhuMAb-VEGF. Otros segundos medicamentos incluyen agentes anti-proliferativos como inhibidores de la transferasa de la proteína farnesil, inhibidores de anti-VEGF, inhibidores de p53, o inhibidores de PDGFR. El segundo medicamento en el presente incluye también la terapia biológica dirigida como el tratamiento con anticuerpos así como también una terapia dirigida de moléculas pequeñas, por ejemplo, contra ciertos receptores.

Se han identificado muchos agentes anti-angiogénicos y son muy conocidos en el área, con la inclusión de aquellos que se nombran en el presente, por ejemplo, los que se listan bajo Definiciones, y por ejemplo, por Carmeliet and Jain, Nature 407:249-257 (2000); Ferrara et al., Nature Reviews:Drug Discovery, 3:391-400 (2004); and Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003). Véase también Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº US20030055006. En una realización, el anticuerpo anti-EGFL7 se utiliza en combinación con un anticuerpo neutralizante anti-VEGF (o fragmento) y/u otro antagonista de VEGF o un antagonista receptor de VEGF con la inclusión de, entre otros, un receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)) fragmentos, aptámeros capaces de bloquear a VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de tirosina quinasas de VEGFR (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas contra receptores de VEGF o VEGF, variantes antagonistas de VEGF; y todas sus combinaciones. En forma alternativa, o adicionalmente, se puede co-administrar en forma opcional dos o más inhibidores de angiogénesis al paciente además del antagonista de VEGF y otro agente. En ciertas realizaciones, pueden administrarse uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes anti-cáncer, en combinación con el anticuerpo anti-EGFL7, el antagonista de VEGF, y un agente anti-angiogénesis.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en el presente se describen supra, por ejemplo, en la definición de “agente quimioterapéutico”.

Dichos segundos medicamentos pueden administrarse dentro de las 48 horas siguientes a la administración de los anticuerpos del presente, o dentro de las 24 horas siguientes, o dentro de las 12 horas siguientes o dentro de las 3-12

horas siguientes a dicho agente, o pueden administrarse durante un período de tiempo pre seleccionado, el cual es preferentemente alrededor de 1 a 2 días. Además, la dosis de dicho agente puede ser sub-terapéutica.

Los anticuerpos en el presente pueden administrarse en forma simultánea, secuencial o alternando con el segundo medicamento o si no hubiera respuesta con otra terapia. Por lo tanto, la administración combinada de un segundo medicamento incluye la co-administración (administración simultánea), mediante formulaciones separadas o una única formulación terapéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferentemente hay un período de tiempo mientras que ambos (o todos) los medicamentos ejercen en forma simultánea sus actividades biológicas. Todos estos segundos medicamentos pueden utilizarse en combinación con otros o solos con el primer medicamento, de manera que la expresión “segundo medicamento” tal como se utiliza en el presente no significa que es el único medicamento aparte del primer medicamento, respectivamente. Por lo tanto, el segundo medicamento no tiene que se un medicamento, pero puede constituir o comprender más de una droga.

Estos segundos medicamentos tal como se establecen en el presente se utilizan generalmente en las mismas dosis y vías de administración que los primeros medicamentos, o alrededor del 1 al 99% de las dosis de los primeros medicamentos. Si dichos segundos medicamentos se utilizan en forma completa, se utilizan en cantidades menores que si el primer medicamento no estuviera presente, especialmente en las dosis subsiguientes más allá de las dosis iniciales con el primer medicamento, a fin de eliminar o reducir los efectos secundarios provocados.

La invención también ofrece métodos y composiciones para inhibir o prevenir la reincidencia del crecimiento tumoral o la reincidencia del crecimiento de células cancerígenas. La reincidencia del crecimiento tumoral o la reincidencia del crecimiento de células cancerígenas se utiliza para describir una condición en la cual los pacientes que están realizando o se tratan con una o más terapias actuales disponibles (por ejemplo, terapias contra el cáncer, como la quimioterapia, terapia de radiación, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia de anticuerpos anti-VEGF, en particular un régimen terapéutico estándar para el cáncer específico) no es adecuada en términos clínicos para tratar los paciente o los paciente ya no reciben ningún efecto beneficioso de la terapia, de modo que los pacientes necesitan terapia

efectiva adicional. Tal como se utiliza en el presente, la frase puede también referirse a una condición de paciente “sin respuesta/ resistente”, por ejemplo, que describe a paciente que responden a la terapia pero sufren efectos secundarios, desarrollan resistencia, no responden a la terapia, no responden en forma satisfactoria a la terapia, etc. En varias realizaciones, un cáncer es una recaída del crecimiento tumoral o una reincidencia del crecimiento de células cancerígenas en donde el número células cancerígenas no se ha reducido en forma significativa o ha aumentado, o no se ha reducido el tamaño del tumor en forma significativa o ha aumentado, o fracasa toda reducción del tamaño o cantidad de células cancerígenas. La determinación de si las células cancerígenas son una reincidencia del crecimiento tumoral o una reincidencia del crecimiento de las células cancerígenas puede realizarse in vivo o in vitro mediante cualquier método conocido en el área para probar la efectividad del tratamiento sobre las células cancerígenas, mediante la utilización de los significados aceptados en el área de “reincidencia" o “resistente” o “sin respuesta” en dicho contexto. Un tumor resistente a un tratamiento anti-VEGF es un ejemplo de reincidencia del crecimiento tumoral.

La invención ofrece métodos de bloqueo o reducción de la reincidencia del crecimiento tumoral o la reincidencia del crecimiento de células cancerígenas en un sujeto mediante la administración del anticuerpo anti-EGFL7 para bloquear o reducir la reincidencia del crecimiento tumoral o la reincidencia del crecimiento de células cancerígenas en el sujeto. En ciertas realizaciones, el antagonista puede administrarse en forma subsiguiente a las otras terapias contra el cáncer. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFL7 se administra en forma simultánea con la terapia contra el cáncer. En forma alternativa o adicionalmente, la terapia del anticuerpo anti-EGFL7 se alterna con otra terapia contra el cáncer, y puede realizarse en cualquier orden. La invención también abarca métodos para la administración de uno o más anticuerpos inhibidores para prevenir la aparición o recurrencia del cáncer en pacientes propensos a tener cáncer. En general, el sujeto realizó o está realizando al mismo tiempo una terapia contra el cáncer. En una realización, la terapia contra el cáncer es un tratamiento con un agente anti-angiogénesis, por ejemplo, un antagonista de VEGF. El agente anti-angiogénesis incluye aquellos conocidos en el área y aquellos que se encuentran bajo las definiciones del presente. En una realización, el agente anti-angiogénesis es 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.). Véase por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; Solicitudes de Patentes de los Estados Unidos 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 un antagonista de VEGF y un anticuerpo anti-EGFL7 para bloquear o reducir la reincidencia del crecimiento tumoral o la reincidencia del crecimiento de células cancerígenas.

Los anticuerpos de la invención (y agentes terapéuticos adjuntos) se administran mediante los medios idóneos, con la inclusión de la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parentales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, los anticuerpos se administran en forma idónea mediante la infusión de pulso, en particular, con dosis decrecientes del anticuerpo. Las dosis pueden aplicarse mediante cualquier vía idónea, por ejemplo, mediante inyecciones, como inyecciones intravenosas o subcutáneas, lo cual depende en parte de si la administración es breve o crónica.

La ubicación de blanco de unión de un anticuerpo de la invención puede tomarse en cuenta en la preparación y administración del anticuerpo. Cuando el blanco de unión es una molécula intracelular, ciertas realizaciones de la invención aseguran la introducción del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en la célula en donde se encuentra el blanco de unión. En una realización, un anticuerpo de la invención puede expresarse en forma intracelular como un intracuerpo. El término “intracuerpo,” tal como se utiliza en el presente, se refiere a un anticuerpo o su porción de unión al antígeno que se expresa en forma intracelular y es capaz de unirse selectivamente a una molécula blanco, tal como se describe, por ejemplo, en Marasco, *Gene Therapy* 4: 11-15 (1997); Kontermann, *Methods* 34: 163-170 (2004); Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.004.940 y 6.329.173; Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 2003/0104402, y Publicación PCT Nº WO2003/077945. Véase también, por ejemplo, WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996, acerca del uso de la terpia de genes para generar anticuerpos intracelulares.

La expresión intracelular de un anticuerpo puede efectuarse mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado o su porción de unión al antígeno (que carece de la secuencia líder de tipo salvaje y las señales secretoras que se asocian normalmente con el gen que codifica ese anticuerpo o fragmento de unión al antígeno) en una célula blanco. Pueden entregarse uno o más ácidos nucleicos que codifican todo o una parte del anticuerpo de la invención a una célula blanco, de manera que uno o más intracuerpos se expresan, los cuales son capaces de unirse a un polipéptido blanco intracelular y modular la actividad del polipéptido blanco. Puede utilizarse todo método estándar para introducir ácido nucleicos en una célula, con la inclusión de, entre otros, microinyección, inyección balística, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, liposomas, y transfección con vectores retrovirales, adenovirales, virales adeno-asociados y de vacunas que portan el ácido nucleico de interés.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) puede introducirse en las células del paciente mediante métodos *in vivo* y *ex vivo*. En un ejemplo de entrega *in vivo*, se inyecta el ácido nucleico directamente en el paciente, por ejemplo, en el sitio en donde se requiere intervención terapéutica. En otro ejemplo de entrega *in vivo*, el ácido nucleico se introduce en una célula mediante la transfección con vectores virales (como adenovirus, virus Herpes simplex I, o virus adeno-asociados) y sistemas a base de lípidos (los lípidos útiles para la transferencia del gen mediada por lípidos son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para una reseña de ciertos protocolos de marcado de genes y de terapia de genes véase Anderson et al., *Science* 256:808-813 (1992), y WO 93/25673 y las referencias que allí se citan. En un ejemplo de tratamiento *ex vivo*, se extraen las células de un paciente, se introduce ácido nucleico en esas células aisladas, y se administran las células modificadas al paciente en forma directa, o por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nros. 4.892.538 y 5.283.187). un vector que se utiliza comúnmente para la entrega *ex vivo* de un ácido nucleico es un vector retroviral.

En otra realización, se proveen los anticuerpos internalizadores. Los anticuerpos pueden poseer características que mejoran la entrega de anticuerpos en las células, o pueden modificarse para poseer dichas características. Las técnicas para obtener esto son conocidas en el área. Por ejemplo, se conoce la cationización de un anticuerpo para facilitar la absorción en las células (véase por

ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nº 6.703.019). Las lipofecciones o liposomas pueden utilizarse también para entregar el anticuerpo a las células. Cuando se utilizan los fragmentos del anticuerpo, el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente a la proteína blanco puede ser ventajoso. Por ejemplo, sobre la base de secuencias de región variables de un anticuerpo, puede diseñarse moléculas de péptidos para mantener la habilidad de unir la secuencia de proteína blanco. Dichos péptidos se pueden sintetizar en forma química y/o producir mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo Marasco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

La entrada de anticuerpos en las células blanco puede mejorarse mediante métodos conocidos en el área. Por ejemplo, ciertas secuencias, como aquellas que derivan de la proteína HIV Tat o de homodominio Antennapedia son capaces de dirigir la absorción eficiente de proteínas heterólogas a través de membranas celulares. Véase por ejemplo, Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96:4325-4329.

Cuando el blanco de unión de un anticuerpo se encuentra ubicado en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención aseguran que el anticuerpo atraviese la barrera hemato-encefálica. Existen varios enfoques conocidos en el área para transportar moléculas a través de la barrera hemato-encefálica, con la inclusión de, entre otros, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre y métodos basados en receptores y canales.

Los métodos físicos para transportar anticuerpos a través de la barrera hemato-encefálica incluyen, entre otros, la elusión completa de la barrera remato-encefálica, o la creación de aberturas en la barrera remato-encefálica. Los métodos de elusión incluyen, entre otros, la inyección directa en el cerebro (véase por ejemplo, Papanastassiou et al., *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)), infusión intersticial/entrega de convección mejorada (véase, por ejemplo, Bobo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2076-2080 (1994)), y la implantación de un dispositivo en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill et al., *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos de creación de aberturas en la barrera incluyen, entre otros, ultrasonido (véase, por ejemplo, Publicación de Patente de los Estados Unidos Nº 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante la administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilización mediante, por ejemplo, bradikinina o permeabilizador A-

7 (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nros. 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y la transfección de neuronas que ocupan la barrera remato-encefálica con vectores que contienen genes que codifican al anticuerpo (véase, por ejemplo, Publicación de Patentes de los Estados Unidos Nº 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hemato-encefálica incluyen, entre otros, el encapsulamiento del anticuerpo en liposomas que se acoplan a los fragmentos de unión del anticuerpo que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera remato-encefálico (véase, por ejemplo, Publicación de Patente de los Estados Unidos Nº 20020025313), y el recubrimiento del anticuerpo en partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 20040204354) o apolipoproteinas E (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 20040131692).

Los métodos basados en las células madre para la transportación de un anticuerpo a través de la berrera hemato-encefálica implican el diseño genético de células progenitoras neurales (NPCs) para expresar el anticuerpo de interés y luego implantar las células madre en el cerebro del individuo a tratar. *Véase* Behrstock et al. (2005) *Gene Ther.* La publicación online adelantada del 15 de diciembre de 2005 (que informa que las NPCs diseñadas genéticamente para expresar el factor neurotrófico GDNF redujeron los síntomas de la enfermedad de Parkinson cuando se implantan en los cerebros de modelos de roedores y primates).

Los métodos basados en receptores y canales para transportar un anticuerpo a través de la barrera hemato-encefálica incluyen, entre otros, la utilización de bloqueadores de glucocorticoide para aumentar la permeabilidad de la barrera remato-encefálica (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nros. 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activación de canales de potasio (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 2005/0089473), inhibición de los transportadores de droga ABC (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 2003/0073713); recubrimiento de anticuerpos con una actividad transferrina y moduladora de o los receptores de transferrina (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº

2003/0129186), y cationización de los anticuerpos (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nº 5.004.697).

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán en un modo coherente con las buenas prácticas médicas. Los factores de consideración en este contexto incluyen el desorden específico que se trate, el mamífero específico que se trate, la condición clínica del paciente, la causa del desorden, el sitio de entrega del agente, el método de administración, el cronograma de administración, y otros factores conocidos por los practicantes de la medicina. No es necesario, pero opcionalmente el anticuerpo puede formularse con uno o más agentes que se utilizan en la actualidad para prevenir o tratar el desorden en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de desorden o tratamiento, y otros factores que se discutieron con anterioridad. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis o vías de administración que se describen en el presente, o alrededor de 1 al 99% de las dosis que se describen en el presente, o en cualquier dosis o vía que se considere apropiada en términos empíricos/clínicos.

Para la invención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la severidad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo y el criterio de médico que lo trate. El anticuerpo se administra en forma apropiada al paciente una sola vez o en una serie de tratamientos. De acuerdo al tipo y la severidad de la enfermedad, alrededor de 1 µg/kg to 15 mg/kg (por ejemplo. 0,1mg/kg-10mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis inicial posible para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones o mediante la infusión continua. Una dosis diaria típica varía de desde 1 µg/kg a 100 mg/kg aproximadamente o más, de acuerdo a los factores que se mencionaron con anterioridad. Para las administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, de acuerdo a la condición, el tratamiento se mantendrá en general hasta que ocurra la eliminación deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosis del anticuerpo puede encontrarse en el rango de 0.05 mg/kg a 10 mg/kg aproximadamente. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de 0.5 mg/kg, 2.0

mg/kg, 4.0 mg/kg o 10 mg/kg aproximadamente (o una combinación de ellas). Dichas dosis pueden administrarse en forma intermitente, *por ejemplo* cada una semana o cada tres semanas (*por ejemplo* aquella que recibe un paciente de dos a veinte, o *por ejemplo* seis dosis de anticuerpo aproximadamente). Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguida de una o más dosis más bajas. Un ejemplo de un régimen de dosis comprende la administración de una dosis de carga inicial de 4 mg/kg aproximadamente, seguida de una dosis de mantenimiento de alrededor de 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se monitorea fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Métodos de Diagnóstico y métodos de detección

Los anticuerpos anti-EGFL7 de la invención son útiles en ensayos que detectan la expresión de EGFL7 (tales como diagnósticos o ensayos prognósticos) en células o tejidos específicos en los que los anticuerpos se rotulan tal como se describe a continuación y/o se inmovilizan en una matriz no soluble.

En otro aspecto, la invención provee métodos para la detección del EGFL7. Los métodos consisten en la detección del complejo del anticuerpo EGFL7-anti-EGFL7 en la muestra. El término "detección" tal como se utiliza en el presente incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control.

En otro aspecto, la invención provee cualquiera de los anticuerpos anti-EGFL7 descriptos en la presente, en donde el anticuerpo anti-EGFL7 comprende un rotulo detectable.

En otro aspecto, la invención provee un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-EGFL7 descriptos en la presente y EGFL7. En algunas realizaciones, el complejo es in vivo o in vitro. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula de cáncer. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFL7 está rotulado en forma detectable.

Los anticuerpos anti-EGFL7 (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos EGFL7 descriptos en la presente) pueden utilizarse para la detección de EGFL7 en cualquiera de los métodos de ensayo de detección conocidos.

Por ejemplo, se puede ensayar una muestra biológica EGFL7 mediante la obtención de una muestra a partir de una fuente deseada, la adición y mezcla de la muestra con el anticuerpo anti-EGFL7 para permitir que el anticuerpo

forme un anticuerpo/ complejo EGFL7 con cualquier EGFL7 presente en la mezcla, y que forme un anticuerpo/complejo EGFL7 presente en la mezcla. Se puede preparar la mezcla biológica para el ensayo mediante métodos conocidos que son idóneos para la mezcla específica. Los métodos para agregar y mezclar la muestra con los anticuerpos y los métodos para detectar anticuerpos/ complejo EGFL7 se eligen según el tipo de ensayo utilizado. Dichos ensayos incluyen inmunohistoquímica, ensayos competitivos y sándwich, y ensayos de inhibición estérica. Para la preparación de muestras, se puede utilizar una muestra de tejido o de célula de un mamífero (típicamente un paciente humano). Los ejemplos de muestras incluyen, entre otros, células de cáncer tales como de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma, y célula de cáncer de leucemia. También se puede medir el EGFL7 en suero. La muestra se puede obtener mediante una variedad de procedimientos conocidos en el área que incluyen, entre otros, la escición quirúrgica, la aspiración o la biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, se fija la muestra y se la embebe en parafina o material similar. La muestra del tejido puede fijarse (es decir, preservarse) mediante un método convencional (Ver, por ejemplo, “Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology,” 3ra edición(1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; *The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology* (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto en la técnica apreciará que la elección de un fijador se determine por el propósito para el cual la muestra se teñirá histológicamente o se analizará de otro modo. Un experto habitual apreciará también que la extensión de la fijación depende del tamaño de la muestra del tejido y el fijador utilizado. A modo de ejemplo, se puede utilizar formol neutral regulado, Bouin o paraformaldehido para fijar una muestra. Generalmente, primero se fija la muestra y luego se la deshidrata mediante una serie ascendente de alcoholes, infiltrados y embebidos con parafina u otro medio de seccionamiento para que se pueda seccionar la muestra del tejido. Como alternativa, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, se puede embeber la muestra del tejido y procesarla en parafina mediante metodología convencional. (Ver, por ejemplo, “Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", *supra*). Algunos ejemplos de parafina que se puede utilizar incluyen,

entre otros, Paraplast, Broloid, y Tissuemay. Una vez que la muestra del tejido esté embebida, el tejido se puede seccionar mediante un micrótomo o similar (Ver, por ejemplo, “Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”, *supra*). A modo de ejemplo para éste procedimiento, las secciones pueden variar de aproximadamente tres micrones a aproximadamente cinco micrones de espesor. Una vez seccionada, se pueden adjuntar las secciones a superficies mediante varios métodos estándar. Algunos ejemplos de adhesivos de superficie incluyen, entre otros, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. A modo de ejemplo, se pueden adjuntar las secciones embebidas con parafina a superficies cargadas en forma positiva y/o superficies cubiertas con poli-L-lisina. Si se ha utilizado parafina como material para embeber, generalmente se desparafinan las secciones de tejido y se las rehidrata en agua. Se pueden desparafinar las secciones de tejido mediante varias metodologías convencionales estándar. Por ejemplo, se pueden utilizar xilenos y una serie gradualmente descendiente de alcoholes. (Ver por ejemplo, “Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”, *supra*). En forma alternativa, se pueden utilizar agentes de desparafinación no orgánicos disponibles en los comercios tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

Todos los métodos analíticos para EGFL7 utilizan uno o más de los siguientes reactivos: análogo de EGFL7 rotulado, análogo de EGFL7 inmovilizado, anticuerpo anti-EGFL7 rotulado, anticuerpo anti-EGFL7 inmovilizado y conjugados estéricos. Los reactivos rotulados también son conocidos como "trazadores."

El rótulo utilizado es una funcionalidad detectable que no interfiere con la unión del EGFL7 y el anticuerpo anti-EGFL7. Numerosos rótulos son conocidos por su utilización en inmunoensayos, los ejemplos incluyen porciones que se pueden detectar en forma directa, tales como fluorocromo, quimicoluminiscencia, y rótulos radioactivos, así como también porciones como enzimas, que deben ser reaccionadas o derivadas para detectarlas.

El rotulo utilizado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiere con la unión del EGFL7 y el anticuerpo anti-EGFL7. Numerosos rótulos son conocidos por su utilización en inmunoensayos, los ejemplos incluyen porciones que se pueden detectar en forma directa, tales como fluorocromo, quimicoluminiscencia, y rótulos radioactivos, así como también porciones como enzimas, que deben ser reaccionadas o derivadas para detectarlas. Los ejemplos de dichos rótulos

incluyen los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, y ^{131}I, fluoroforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferona, luceriferasas, por ejemplo, luciferasa de las luciérnagas y luciferasa bacterial (Patente de Estados Unidos N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindiones, peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasa de sacarida, por ejemplo, oxidasa de glucosa, oxidasa de galactosa, y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y oxidasa de xantina, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de teñido como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, rótulos de spin, rótulos de bacteriófago, radicales libres estables, y similares.

Los métodos convencionales están disponibles para unir estos rótulos en forma covalente a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, al acoplar agentes tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, bis-diazotizedo benzidina, y similares se pueden utilizar para etiquetar los anticuerpos con los rótulos fluorescentes, quimiluminiscentes y de enzimas antes descriptos. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos. N.º 3.940.475 (fluorimetría) 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. Methods*, **40**: 219-230 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.,* **30**: 407-412 (1982). Los rótulos preferidos en la presente son enzimas tales como la peroxidasa de rabano picante y fosfatasa alcalina. La conjugación de dicho rótulo, con la inclusión de enzimas, al anticuerpo es un procedimiento manipulativo estándar para un experto en técnicas de inmunoensayos. Ver, por ejemplo, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

Se requiere la inmovilización de reactivos para ciertos métodos de ensayo. La inmovilización implica la separación del anticuerpo anti-EGFL7 de cualquier EGFL7 que permanece libre en la solución. Convencionalmente esto se logra insolubilizando el anticuerpo anti-EGFL7 o análogo de EGFL7 antes del procedimiento del ensayo, tanto mediante la absorción a una matriz o superficie no soluble en agua (Bennich *et al.*., U.S. 3.720.760), mediante el acoplamiento covalente (por ejemplo, con la unión cruzada de glutaraldehído), o insolubilizando

el anticuerpo anti-EGFL7 o análogo de EGFL7, por ejemplo, mediante la inmunoprecipitación.

La expresión de proteínas en una muestra se puede examinar mediante el uso de protocolos de inmunohistoquímica y tinción. Se ha demostrado que la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido es un método confiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para explorar y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente mediante métodos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de muestras, se puede utilizar una muestra de tejido o célula de un mamífero (típicamente un paciente humano). Se puede obtener la muestra mediante una variedad de procedimientos conocidos en el área, ente otros, exición quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, se fija la muestra y se la embebe en parafina o similar. La muestra del tejido puede fijarse (es decir, preservarse) mediante métodos convencionales. Un experto apreciará que la elección de un fijador se determine por el fin para el cual la muestra se tiñe histológicamente o se analiza. Un experto apreciará también que la extensión de la fijación dependa del tamaño de la muestra del tejido y del fijador utilizado.

Se puede llevar a cabo la IHC junto con técnicas adicionales como la tinción morfológica y/o hibridación fluorescente *in-situ*. Hay dos métodos generales de IHC disponibles; ensayos directos e indirectos. Según el primer ensayo, la unión de un anticuerpo al antígeno blanco (por ej, EGFL7) se determina en forma directa. Este ensayo directo utiliza un reactivo rotulado, tal como una etiqueta fluorescente o un anticuerpo primario rotulado con enzimas, que se puede visualizar sin interacción adicional del anticuerpo. En un ensayo indirecto típico, los anticuerpos primarios no conjugados se unen al antígeno y luego un anticuerpo secundario rotulado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga a un rótulo enzimático, se agrega un sustrato cromogénico o fluorogénico para brindar visualización del antígeno. La amplificación de la señal ocurre debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario utilizado para la inmunohistoquímica será típicamente rotulado con una porción detectable. Hay disponibles numerosos rótulos.

Además de los procedimientos de preparación de la muestra mencionados anteriormente, se pueden desear tratamientos adicionales de la sección del tejido antes, durante o después de la IHC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo métodos de recuperación del epítopo, tales como el calentamiento de una muestra del tejido en un buffer de citrato (véase, *por ejemplo*, Leong *et al. Appl. Immunohistochem*. 4(3):201 (1996)).

Luego de una etapa de bloqueo opcional, la sección del tejido se expone a un anticuerpo primario por un período de tiempo suficiente y bajo condiciones apropiadas, para que el anticuerpo primario se una al antígeno de proteína blanco en la muestra de tejido. Las condiciones apropiadas para lograr esto se pueden determinar mediante experimentación de rutina. El alcance de la unión del anticuerpo a la muestra se determina mediante el uso de uno de los rótulos detectables, anteriormente mencionados. Preferentemente, el rótulo es un rótulo enzimático (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cronogénico como 3,3'-diaminobenzidina cromógena. Preferentemente el rótulo enzimático se conjuga al anticuerpo que une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es un anticuerpo anti-conejo de cabra).

Las muestras preparadas de este modo se pueden montar y cubrir. Luego se determina la evaluación de la superficie, por ejemplo se puede emplear la utilización de un microscopio, o criterios de intensidad de tinción, utilizados en forma rutinaria.

Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o ensayos sándwich, están bien establecidos y son comúnmente usados en la industria de diagnósticos comerciales.

Los ensayos competitivos se basan en la habilidad de un análogo de EGFL7 trazador para competir con la muestra de prueba EGFL7 con una cantidad limitada de sitios de unión al antígeno de anticuerpos anti-EGFL7. El anticuerpo anti-EGFL7 es generalmente insolubilizado antes o después de la competencia y luego el trazador y el EGFL7 unido al anticuerpo anti-EGFL7 se separan del trazador no unido y el EGFL7. Esta separación se logra mediante la decantación (en donde se preinsolubilizó la parte a unir) o mediante la centrifugación (en donde se precipitó la parte a unir luego de la reacción competitiva). La cantidad de muestra de prueba EGFL7 es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unido, tal como se mide por la cantidad de sustancia marcadora. Se preparan las

curvas de respuesta de dosis con cantidades conocidas de EGFL7 y se comparan con los resultados de las pruebas para determinar en forma cuantitativa la cantidad de EGFL7 presente en la muestra de la prueba. Estos ensayos se llaman sistemas ELISA cuando se utilizan las enzimas como los marcadores detectables.

Otras especies de ensayos competitivos, llamados ensayo “homogéneo” no requieren una fase de separación. Aquí, se prepara un conjugado de una enzima con el EGFL7 y se lo utiliza para que cuando un anticuerpo anti-EGFL7 se una al EGFL7, la presencia del anticuerpo anti-EGFL7 modifique la actividad de la enzima. En este caso, el EGFL7 o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico bifuncional a una enzima como la peroxidasa. Se seleccionan los conjugados para su utilización con el anticuerpo anti-EGFL7 para que la unión del anticuerpo anti-EGFL7 inhiba o potencie la actividad de la enzima del rótulo. Este método *per se* es ampliamente practicado bajo el nombre EMIT.

Los conjugados estéricos se utilizan en métodos de obstaculización estérica para ensayos homogéneos. Estos conjugados se sintetizan mediante la unión en forma covalente de un hapteno de peso molecular bajo a un fragmento pequeño de EGFL7, de manera que ese anticuerpo al hapteno no pueda unir, en forma sustancial, el conjugado al mismo tiempo que el anticuerpo anti-EGFL7. Conforme al presente procedimiento de ensayo, el EGFL7 presente en la muestra de prueba se unirá al anticuerpo anti-EGFL7, y de ese modo permitirá que el anti-hapteno una al conjugado, lo cual resultará en un cambio en el carácter del conjugado hapteno, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

Los ensayos sándwich son particularmente útiles para la determinación de los anticuerpos EGFL7 o anti-EGFL7. En ensayos sándwich secuenciales se utiliza un anticuerpo anti-EGFL7 inmovilizado para absorber la muestra de prueba EGFL7, se remueve la muestra de prueba mediante el lavado, se utiliza el EGFL7 unido para absorber un segundo anticuerpo anti-EGFL7 rotulado y luego se separa el material unido del trazador residual. La cantidad de trazador unido es directamente proporcional al EGFL7 de muestra de prueba. En ensayos sándwich "simultáneos" no se separa la muestra de prueba antes de agregar el anti-EGFL7 rotulado. Un ensayo sándwich secuencial que utiliza un anticuerpo monoclonal anti-EGFL7 como un anticuerpo y un anticuerpo policlonal anti-EGFL7 como el otro es útil al probar las muestras para EGFL7.

Los anteriores son ejemplos de ensayos de detección para EGFL7. Otros métodos desarrollados ahora o en adelante que utilicen el anticuerpo anti-EGFL7 para la determinación de EGFL7 se incluyen dentro del alcance del presente, con la inclusión de los bioensayos descriptos en el presente.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para detectar (por ejemplo, presencia, ausencia o cantidad de) un polinucleótido(s) (por ejemplo, polinucleótidos EGFL7) en una muestra biológica de un individuo, como un sujeto humano. Se pueden emplear e incluir una variedad de métodos para detectar polinucleótidos, por ejemplo, RT-PCR, taqman, métodos de amplificación, micromatrices de polinucleótidos, y similares.

Los métodos para la detección de polinucleótidos (tales como ARNm) son conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación mediante el uso de sondas de ADN complementarias (tales como hibridación *in situ* mediante el uso de ribosondas EGFL7 rotuladas), Northern blot y técnicas relacionadas, y varios ensayos de amplificación de ácido nucleico (como RT-PCR mediante la utilización de cebadores complementarios específicos para el EGFL7, y otros métodos de detección del tipo de amplificación, como, por ejemplo, ADN ramificado, SPIA, Ribo-SPIA, SISBA, TMA y similares).

Las muestras biológicas de mamíferos se pueden ensayar en forma conveniente, por ejemplo, EGFL7 ARNm con utilización de análisis Northern, dot blot o PCR. Por ejemplo, los ensayos RT-PCR como ensayos PCR cuantitativos se conocen en la técnica. En una realización ilustrativa de la invención, un método para detectar ARNm de EGFL7 en una muestra biológica consiste en la producción de ADNc a partir de la muestra mediante la transcripción reversa con al menos un cebador; amplificación del ADNc producido mediante el uso de un polinucleótido de EGFL7 como cebadores de sentido y antisentido para amplificar el ADNc del EGFL7 del mismo; y la detección de la presencia o ausencia del ADNc de EGFL7 amplificado. Además, dichos métodos pueden incluir uno o más pasos que permiten determinar la cantidad (niveles) de ARNm de EGFL7 en una muestra biológica (por ejemplo, mediante el examen simultáneo de los niveles y un control comparativo de la secuencia de ARNm de un gen constitutivo como un miembro de la familia de la actina). En forma opcional, se puede determinar la secuencia del ADNc de EGFL7 amplificado.

Se pueden rotular las sondas y/o cebadores con un marcador detectable, como por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto

bioluminiscente, un compuesto químicoluminiscente, quelante de metal o enzima. Dichas sondas y cebadores se pueden utilizar para detectar la presencia de polinucleótidos de EGFL7 en una muestra y como un medio para detectar una célula que expresa proteínas de EGFL7. Tal como entenderán los expertos habilidosos, se pueden preparar varios cebadores y sondas diferentes (por ejemplo, sobre la base de la secuencia provista en la presente) y utilizar en forma efectiva para amplificar, clonar y/o determinar la presencia, ausencia o cantidad de ARNm de EGFL7.

Los métodos opcionales de la invención incluyen protocolos que comprenden la detección de polinucleótidos, tales como polinucleótido de EGFL7, en una muestra de tejido o célula mediante tecnologías de micromatrices. Por ejemplo, mediante el uso de micromatrices de ácido nucleico, se transcriben en forma reversa las muestras ARNm de control y prueba de muestras de tejido de control y prueba, y se rotulan para generar sondas de ADNc. Luego se hibridizan las sondas a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. La matriz se configura de modo tal que la secuencia y la posición de cada miembro de la matriz se conozca. Por ejemplo, una selección de genes que tienen potencial para ser expresados en ciertos estados de la enfermedad pueden distribuirse en un soporte sólido. La hibridación de una sonda rotulada con un miembro de la matriz particular indica que la muestra de la que derivó la sonda expresa el gen. El análisis de la expresión de un gen diferencial de un tejido enfermo puede ofrecer información valiosa. La tecnología de micromatriz utiliza técnicas de hibridación de ácido nucleico y tecnología informática para evaluar el perfil de la expresión ARNm de miles de genes dentro de un experimento único. (Ver, por ejemplo WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; (Ver, por ejemplo, Estados Unidos 5.700.637, Patente de Estados Unidos 5.445.934, y Patente de Estados Unidos 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999) para una discusión de fabricación de matrices). Las micromatrices de ADN son matrices miniatura que contienen fragmentos de genes que están sintetizados en forma directa o teñidos en vidrio u otros sustratos. Usualmente se representan miles de genes en una única matriz. Un experimento de micromatriz típico incluye las siguientes etapas: 1. preparación de blancos rotulados fluorescentes de ARN aislado de la muestra, 2. hibridación del blanco rotulado a la micromatriz, 3.lavado, tinción, y escaneo de la matriz, 4. análisis de la imagen escaneada y 5. generación de perfiles de expresión de gen.

En la actualidad, se están utilizando dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (usualmente 25 a 70 mers) y matrices de expresión de gen que contienen productos PCR preparados a partir de ADNc. Al forma una matriz, los oligonucleótidos pueden estar tanto prefabricados y colocados en la superficie o directamente sintetizados sobre la superficie (in situ).

El sistema Affymetrix GeneChip® es un sistema de micromatriz disponible en los comercios que comprende matrices fabricadas mediante la síntesis directa de oligonucleótidos en una superficie de vidrio. Matrices de Sonda/Gén: Oligonucleótidos, usualmente 25 mers, están sintetizadas en forma directa en una oblea de vidrio mediante una combinación de fotolitografía basada en semiconductores y tecnologías de síntesis química de fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligos diferentes y cada oligo está presente en millones de copias. Debido a que las sondas oligonucleótidos se sintetizan en ubicaciones conocidas en la matriz, los patrones de hibridación e intensidades de señal pueden interpretarse en términos de identidad génica y niveles de expresión relativos mediante el software de Affymetrix Microarray Suite. Cada gen es representado en la matriz mediante una serie de sondas oligonucleótidas diferentes. Cada par de sondas consiste en un oligonucleótido de unión perfecta y un oligonucleótido imperfecto. La sonda de unión perfecta tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular y por lo tanto mide la expresión del gen. Esta sonda imperfecta difiere de la sonda de unión perfecta por una sustitución de base en la posición de base del centro, y de ese modo perturba la unión de la transcripción del gen blanco. Esto ayuda a determinar los antecedentes y la hibridación no específica que contribuye a la señal medida para el oligo de unión perfecta. El software de Microarray Suite sustrae las intensidades de hibridación de las sondas imperfectas de aquellas de las sondas de unión perfecta para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada par de sondas. Las sondas se elijen en base a información actual del GenBank® y otros repositorios de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas del extremo de 3’ del gen. Se utiliza un GeneChip® Hybridization Oven (horno “rotisserie”) para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices al mismo tiempo. La estación de fluídicos realiza el lavado y teñido de las matrices de sonda. Está completamente automatizada y contiene cuatro módulos que contienen cada uno una matriz de sonda. Cada modulo es controlado en forma independiente mediante el software Microarray Suite mediante protocolos fluídicos

preprogramados. El escáner es un escáner fluorescente láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc rotulado unido a las matrices de sonda. La estación de trabajo de la computadora con software Microarray Suite controla la estación fluídica y el escáner. El software del Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones fluídicas por medio de la hibridación preprogramada, lavado, y protocolos de tinción para la matriz de sonda. El software también adquiere y convierte datos de intensidad de hibridación en un llamado de presencia/ausencia para cada gen mediante algoritmos idóneos. Finalmente, el software detecta cambios en la expresión génica entre experimentos mediante análisis de comparación y formatea el resultado en archivos .txt, que se pueden usar con otros programas de software para posterior análisis de datos.

En algunas representaciones, el tratamiento es para un cáncer seleccionado del grupo que consiste de cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de pituitaria, cáncer de páncreas, fibroadenoma mamario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de mama, neuroblasomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), carcinoma epitelial, cáncer de cerebro, cáncer endometrial, cáncer de testículo, colangiocarcinomas, carcinoma de vesícula, y carcinoma hepatocelular.

En el presente se describen las muestras biológicas, por ejemplo, en la definición de Muestra Biológica. En alguna realización, la muestra biológica es suero o de un tumor.

Artículos de Fabricación

En otro aspecto de la invención, se suministra un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los desordenes descriptos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y un rótulo o un prospecto en el contenedor o asociado con el mismo. Los contenedores idóneos incluyen, por ejemplo, botellas, ampollas, jeringas, etc. Los contenedores se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor posee una composición que es eficiente por sí misma, o combinada con otra composición(es) para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la condición y pueden tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o una ampolla que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al

menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. El rótulo o el prospecto indican que la composición se utiliza para tratar la condición de elección, como el cáncer. Aún más, el artículo de manufactura puede consistir en (a) un primer contenedor con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo contenedor con una composición contenida en el mismo. El artículo de manufactura la presente realización de la invención puede también comprender un prospecto que indica que se puede utilizar la primera y la segunda composición de anticuerpos para tratar una condición particular, por ejemplo, cáncer. En forma alternativa, o adicional, el artículo de fabricación puede también comprender un segundo (o tercer) contenedor que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyecciones (BWFI), solución salina regulada con fosfato, solución Ringer y solución dextrosa. También puede incluir otros materiales que pueden desear el comerciante y el usuario, con la inclusión de buffers, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se comprende que se pueden practicar varias otras realizaciones, dada la descripción general provista con anterioridad.

EJEMPLOS

Se utilizaron reactivos disponibles en los comercios a los que se hace referencia en los Ejemplos, conforme a las instrucciones del fabricante, excepto indicación en contrario.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos mu4F11 humanizados

El presente ejemplo muestra la humanización del anticuerpo 4F11 murino (mu4F11) dirigido contra EGFL7. Los números de residuo son conforme a Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5ta Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se utilizan abreviaturas de aminoácidos de una única letra.

Materiales y Métodos

Se expresaron EGFL7 humano de longitud completa y una forma truncada de EGFL7 humano (residuos 1-182) que contienen los dominios EMI y 2 EGF (sin los 2 dominios de doble alfa hélice) en células CHO y se purificaron mediante medios convencionales (**Figura 1**). Los péptidos que contienen el epítope 4F11 en EGFL7 llamados p2 (RPRYACCPGWKRT; SEC ID Nº: 5) y EMI2

(PARPRYACCPGWKRTSGLPGACGAAICQPP; SEC ID Nº: 4) se realizaron sintéticamente.

Un hibridoma que expresa el anticuerpo 4F11 murino se obtuvo mediante la inmunización de los ratones knockout *Egfl7* con proteína de EGFL7 recombinante humano de extensión completa expresadas en *E. coli* y se replegaron. Se monitorearon los anticuerpos con ELISA a través de placas recubiertas de EGFL7 humano o murino recombinante. Se identificó un panel de anticuerpos de bloqueo de funciones por su habilidad para bloquear la adhesión HUVEC a las placas recubiertas de EGFL7. Se identificaron varios anticuerpos como anticuerpos con función de bloqueo de especies cruzadas, con la inclusión de una designada 4F11 (Ver la Solicitud de Patente Internacional WO 2007/106915, presentada el 16 de marzo de 2007 y publicada el 20 de septiembre de 2007).

Clonación de dominios variables 4F11 murino y generación de un anticuerpo 4F11 quimérico Se extrajo el ARN total de las células de hibridoma que producían 4F11 mediante el uso de métodos estándar. Se amplificaron los dominios de variable liviana (VL) y variable pesada (VH) mediante el uso de RT-PCR con cebadores degenerativos a las cadenas pesadas y livianas. Los cebadores directos eran específicos para la secuencia del aminoácido N- terminal de las regiones VL y VH. Respectivamente, los cebadores inversos LC y HC se designados para alinearse a una región en el dominio liviano constante (CL) y el dominio 1 pesado constante (CH1), que están altamente conservados entre las especies. Se clonaron VL y VH amplificados en vectores de expresión mamífera para generar un anticuerpo ch4F11 quimérico. Se determinó la secuencia del polinucleótido de las inserciones mediante métodos de secuenciamiento de rutina.

Injertos directos de región hipervariable en el marco consenso humano aceptamte – El fagémido utilizado para este trabajo es un vector de muestra Fab-g3 y consiste de 2 marcos de lectura abiertos bajo el control de un promotor phoA único. El primer marco de lectura abierto consiste en la secuencia de señal stII fusionada con los dominios VL y CH1 de la cadena liviana del aceptante y el segundo consiste en la secuencia de señal stII fusionada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada del aceptante, seguida por la proteína P3 de capa de fago menor.

Para realizar los injertos de CDR, se injertaron las regiones hipervariables del mu4F11 en los marcos aceptantes de consenso huIII para generar el injerto CDR directo (4F11.v1) (**Figuras 2 y 3**). En el dominio VL se injertaron las

siguientes regiones al aceptante de consenso humano: posiciones 24-34 (L1; SEC ID Nº: 31), 50-56 (L2; SEC ID Nº: 32) y 89-97 (L3; SEC ID Nº: 33). En el dominio VH se injertaron las posiciones 26-35 (H1; SEC ID Nº: 34), 49-65 (H2; SEC ID Nº: 35) y 95-102 (H3; SEC ID Nº: 36). MacCallum et al. (MacCallum *et al. J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) han analizado las estructuras de cristal complejas del antígeno y del anticuerpo y descubrieron que la posición 49 de la cadena pesada es parte de la región de contacto, por lo tanto resulta razonable incluir esta posición en la definición de CDR-H2 al humanizar los anticuerpos.

Se generó 4F11.v1 mediante la mutagénesis de Kunkel tanto como un Fab exhibido en un fago y como un IgG que utiliza oligonucleótidos separados para cada región hipervariable. Se identificaron clones correctos mediante el secuenciamiento de ADN.

Interruptor de Marco – Para identificar las posiciones del marco importantes para la unión, se generó una genoteca de fago de interruptor de marco para ofrecer tanto el aminoácido murino como humano en la posición 4 en VL, y en las posiciones 2, 48, 69, 71, 73, 75, 76, 78 y 91 en VH. Estas posiciones se diversificaron tal como lo muestra la **Figura 4**, mediante la mutagénesis de Kunkel, mediante la utilización de 5 oligonucleótidos para mutar 4F11.v1 que se utilizó como patrón.

Randomización de las regiones hipervaribles – La diversidad de secuencia se introdujo en posiciones en las regiones hipervariables mediante la mutagénesis de Kunkel. Para generar una genoteca de posición única (SPL), se distribuyó en forma aleatoria cada posición en la región hipervariable a todos los 20 posibles aminoácidos mediante la utilización de oligonucleótidos que codifican NNS. Esto resultó en 76 sub genotecas, cada una con una diversidad de 20 que se combinaban en una “genoteca de posición única” (SPL) que abarcaba variantes con una única mutación ubicada dentro de las regiones hipervariables. Las seis plantillas que se utilizaron para la mutagénesis tienen un codón de stop (TAA) en el medio del CDR L1, L2, L3 H1, H2 o H3 para evitar la reselección de la secuencia de tipo salvaje. Al generar la SPL, los oligonucleótidos utilizados para introducir diversidad también repararon el codón de stop en la plantilla correspondiente.

Para las genotecas limitadas, se incorporaron 4 oligonucleótidos en forma simultánea que repararon los codones de stop (TAA) e introdujeron NNS en las posiciones 53 y 54 en CDR-L2, 29 n CDR-H1, 52 en CDR-H2 y 98 en CDR-H3.

Generación de genotecas de fago – Los oligonucleótidos diseñados para introducir diversidad en las posiciones de marco o regiones hipervariables descriptas anteriormente, fueron fosforilados en forma separada en reacciones de 20 µl que contienen 660 ng de oligonucelótidos, 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 20 mM DTT, y 5 U polinucleótido quinasa durante 1 hora a 37°C.

Para generar el interruptor del marco o genotecas limitadas se agregaron todos los oligonucleótidos fosforilados direccionados para introducir diversidad en forma simultánea a la reacción de mutagénesis. Para la SPL, se realizaron 76 reacciones de mutagénesis de Kunkel individuales en 96 placas de pocillo PCR. De las reacciones de oligonucleótidos fosforilados (anteriores), se agregaron 2 µl a una plantilla Kunkel de 300 ng que contiene el codón de stop correspondiente en 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$ en un volumen final de 10 µl. La mezcla se recoció a 90°C durante 2 min, 50°C durante 5 min y luego se la enfrió en hielo. La plantilla recocida se rellenó luego agregándole 0,5 µl 10 mM ATP, 0,5 µl 10 mM dNTPs (10 mM cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl 100 mM DTT, 1 µl 10X TM buffer (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M $MgCl_2$), 80 U T4 ligasa, y 4 U T7 polimerasa en un volumen total de 20 µl durante 2 h a temperatura ambiente. Estos productos que se rellenaron y ligaron, luego se transformaron en XL1-Blue celular, cultivadas en 0,5 ml de 2YT con 5 µg/ml de tetraciclina y fago ayudante M13/KO7 (MOI 10) durante 2 hr a 37°C y luego se juntó y transfirió a 500 ml 2YT con 50 µg/ml carbenicilina y se cultivaron 16 horas a 37°C.

Selecciones de fago – Se utilizaron múltiples formas de antígeno para las selecciones de fago. Se inmovilizaron (5 µg/ml) de ESFL7 de extensión completa o truncados en 50 mM de bicarbonato de sodio pH 9,6 en placas de microtitulación MaxiSorp™ (Nunc) durante toda la noche a 4°C. EMI2 y péptidos p2 fueron también biotinilados tanto a través de su cisteína libre (mediante la utilización de maleimida PEO_2-biotina; Pierce) o a través de la amina libre en su término amino (mediante la utilización de NHS-LC-biotina, Pierce). Para las reacciones de biotinilación, se utilizó un reactivo de biotina de doble exceso molar en PBS. Se capturaron EMI2 biotinilados y péptidos p2 en NeutrAvidin® (2 µg/ml) que se habían inmovilizado en 50 mM de bicarbonato de sodio pH 9,6 en placas de microtitulación MaxiSorp™ (Nunc) durante toda la noche a 4°C. Se bloquearon todas las placas durante al menos 1 hora mediante Blocker™ Casein (Pierce).

Su extrajeron fagos de las partículas flotantes del cultivo y suspendieron en PBS con 5 % de leche en polvo y 0,05 % Tween™ 20 (PBSBT). Luego del agregado de la genoteca de fago y 1 hora de incubación, los pocillos de microtitulación se lavaron en forma cuidadosa con PBS con 0,05 % Tween™ 20 (PBST) y se eluyó el fago unido mediante la incubación de pocillos con 20 mM HCl, 500 mM KCl durante 30 min. Los fagos eluídos se neutralizaron con 1 M Tris, pH 8 y amplificaron con células XL1-Blue y fagos ayudantes M13/KO7 y se cultivaron durante la noche a 37°C en 2YT, 50 µg/ml carbenicilina. Las titulaciones de fago eluídas de un pocillo contenedor del blanco se compararon con las titulaciones del fago recuperado de un pocillo que no contiene el blanco para evaluar el enriquecimiento.

Se aumentó la exigencia de la selección tanto mediante la capturación de fago que llevó a la disminución de concentraciones de péptidos p2 biotinilado en una solución, seguido por la captura en NeutrAvidin® durante 10 min (dentro de la selección del índice) y mediante el aumento del tiempo de lavado y la temperatura para permitir que los fagos de unión se laven (selección de tasa de disociación).

Producción de IgG – A los fines del monitoreo, las variantes de IgG se produjeron en forma inicial en 293 células. Los vectores con códigos VL y VH (25 µg) se transfectaron en 293 células mediante el sistema FuGENE®. Se mezclaron 500 µl de FuGENE® con 4,5 ml de medio DMEM que no contiene FBS y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregó cada cadena (25 µg) a esta mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y luego se transfirió a cinco matraces T-150 para la transfección durante la noche a 37°C en 5% CO_2. Al día siguiente, el medio que contenía la mezcla de transfección se extrajo y reemplazó con 23 ml de medio PS04 con 0,1 ml/L de elementos de rastreo (A0934) y 10 mg/L insulina (A0940). Se incubaron las células por un periodo adicional de 5 días luego del cual el medio se cultivó a 1000 rpm durante 5 min y se esterilizó mediante un filtro de unión de proteínas bajo de 0,22 µm. Las muestras se pueden almacenar a 4°C luego de agregar 2,5 ml 0,1% PMSF por cada 125 ml de medio.

Determinaciones de Afinidad –Las determinaciones de afinidad se llevaron a cabo mediante una resonancia de plasmón superficial mediante un BIAcore™-2000. Se inmovilizó el EGFL7 truncado o el péptido p2 (aproximadamente 50 – 200 RU) en 10 mM de acetato de sodio pH 4,8 en un chip de sensor CM5. Se inyectaron variantes purificadas de IgG (mediante una dilución

serial doble de 0,5 a 1000 nM en PBST) a una velocidad de flujo de 30 µL/min. Se analizó cada muestra con una asociación de 3-minutos y una disociación de 3,5 minutos. Luego de cada inyección se regeneró el chip mediante 10 mM glicina pH 1,7.

La respuesta de unión se corrigió mediante la sustracción de una célula de flujo de control de las células de flujo variante IgG. Se utilizó un modelo A 1:1 Languir de prueba simultánea de k_{on} y k_{off} para los análisis cinéticos.

Ensayo de Adhesión de Célula – Se recubrió el EGFL7 de ratón (mEGFL7-CB-His) o EGFL7 humano (EGFL7-CB-His) en placas de microtitulación a 5 µg/ml en buffers de carbonato de sodio O/N a 4°C y luego se bloquearon con 1% BSA en PBS. Se agregaron los anticuerpos anti-EGFL7 (0,01 µg/ml a 100 µg/ml), seguido de la adición de 20.000 Células Endoteliales de Cordón Umbilical Humano (HUVEC)/pocillo en un medio de crecimiento de célula idóneo (EGM Lonza). Se sembraron las células de control en pocillos sin anticuerpo para calcular el 100% de las células sembradas. Cada concentración de anticuerpo se examinó por triplicado. Las placas se giraron durante 5 min a 140 g para sincronizar el contacto de las células con el sustrato y luego se incubaron en una incubadora de CO_2 durante 30 min y se lavaron 3 veces con PBS. Las células que se adhirieron a las placas se contaron mediante la utilización de CyQUANT® (Sondas Moleculares) y se calcularon como porcentaje del total de las células colocadas en placas. Los porcentajes de células que se unen a la placa se graficaron en relación con las concentraciones de cada anticuerpo.

Resultados y Explicación

Humanización de 4F11 – El marco aceptante humano utilizado para la humanización de mu4F11 se basa en el dominio VL kappa I de consenso humano y el dominio VH de subgrupo III de consenso humano. Cada región determinante de complementaridad (CDR) para mu4F11 se identificó e injertó en el marco humano para generar un injerto CDR (4F11. Vl) que se puede exhibir como en Fab en fago (**Figuras 2 y 3**).

Evaluación de Antígeno para la selección de fago – El epítopo 4F11 del EGFL7 se mapeó para el segundo dominio EMI y específicamente a un péptido p2 que utiliza un análisis Western blot (**Figura 1 y 5**). Se observó la exhibición de fago de 4F11.v1 unido al EGFL7 de extensión completa y truncado, pero también se observó una unión de fago no específica utilizando un control de fago (**Figura 6**). Por este motivo, se utilizaron los péptidos p2 y EMI2 que bloquean el 4F11 que

se une al EGFL7 truncado para las selecciones de fago. Los péptidos fueron biotinilados mediante cisteína libre para generar p2S y EMI2c (usando maleimida PEO_2-biotina; Pierce) o mediante la amina libre en su término de amino para generar p2N y AMI2n (mediante NHS-LC-biotina, Pierce). Para evaluar la unión, se capturaron péptidos biotinilados en pocillos de microtitulación cubiertos con NeutrAvidin®. Se usó la exhibición de fago del 4F11.v1 para evaluar la unión a péptidos EMI2 y o2 biotinilados. Se unió el fago 4F11.v1 al mejor p2S (**Figura 7**). La cantidad de fago capturada fue mayor cuando se utilizó una concentración de 50 nM de péptido biotinilado para unirse al pocillo cubierto de NeutrAvidin®.

Posiciones de marco de monitoreo – La genoteca de interruptor del marco se paneó durante 4 rondas de selección sobre el péptido biotinilado p2S inmovilizado. El análisis de secuencia de ADN de 96 clones de la última ronda se utilizó para evaluar la importancia del amino ácido, en base a la abundancia, en cada posición de interruptor (**Figura 8).** La abundancia de aminoácidos con anterioridad y luego de 4 rondas de selección sugirió que el reemplazo de L78 con Thr (L78T) o Val (L78V) podría llevar a una mejora de la unión.

Análisis de posiciones CDR – Para identificar la cantidad de mejoras, se generaron las Genotecas de Posición Única mediante la utilización de 3 marcos: el injerto CDR inicial (4F11.v1), 4F11.v1 con L78T (4F11.v2), y 4F11.v1 con L78V (4F11.v3). Para cada SPL, cada posición en cada CDR se distribuyó individualmente en forma aleatoria a todos los aminoácidos posibles (un total de 76 genotecas, cada una con 20 miembros, reunidos en una sola SPL para cada marco). Se utilizaron seis plantillas de ADN 4F11.v1 (que contienen codones de stop en los CDRs apropiados) para generar las tres SPLs. Se introdujo el cambio de marco en la posición 78 en VH durante la generación de la SPL mediante el uso de codificación de oligonucleótidos mutagénicos para el cambio de marco apropiado (L78V o L78V). Por lo tanto, las posiciones CDR individuales y del marco mutaron en forma simultánea. Se panearon las SPLs en péptido p2S soluble que se capturó mediante NeutrAvidin® inmovilizado, tal como lo muestra la **Tabla 1**:

Tabla 1. Condiciones de Selección de Fagos SPL

	Selección Kon		Selección Koff	
	Antígeno	Tiempo de Unión	Exceso de Péptidos	Captura
Ronda 1	P2S inmovilizado(50 nM en NeutrAvidin®)	1 hora	Ninguno	–
Ronda 2	p2S inmovilizado (50 nM en NeurAvidin)	1 hora	Ninguno	–
Ronda 3	20 nM p2S en solución	30 min	3 horas	10 min
Ronda 4	5 nM p2S en solución	30 min	4,5 horas; 37°C	10 min
Ronda 5	10 nM p2S en solución	20 min	70 horas; 37°C	10 min

La rigurosidad de selección aumentó gradualmente mediante la reducción de la concentración de péptido psS, la reducción del tiempo asignado para la unión y el aumento del tiempo de lavado y la temperatura. El mayor recupero de fagos durante las últimas 3 rondas de selección se observó con SPLs basados en 4F11.v2 y 4F11.v3.

Se recolectaron clones de la última ronda para un análisis de la secuencia de ADN. Se identificaron cambios de secuencia individual en cada CDR (**Figura 9**). Los clones SPL más abundantes tuvieron cambios en VL en la posición N53Y en CDR-L2. Los cambios que aparecieron con más frecuencia y en más de una SPL se incorporaron en 4F11.v3. Estas variantes (.v4 a través de .v12), el injerto 4F11 (.v1) y los cambios en el marco VH (4F11.v2 y 4F11.v3), se expresaron como IgG, purificado y examinado para la unión al p2S inmovilizado con Biacore y mediante el Ensayo de Adhesión de Célula (**Tabla 2**). La inhibición más débil de adhesión de célula que se observó para 4F11.v6 y 4F11.v10 en comparación con mu4F11 indicó que se deseaban más mejoras de afinidad.

Tabla 2. Variantes 4F11 Humanizadas expresadas como IgG

Variante Hu4F11	Cadena Liviana	Cadena Pesada	Unión a p2S (Biacore™)			Ensayo de Adhesión de Célula
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	Variante/ch4F11 (veces)
quimera			2,21E+05	7,51E-4	3,44	1,00
.v1	Injerto	Injerto	3,42E+04	3,31E-03	96,8	
.v2	Injerto	Injerto + 78T	5,35E+04	2,91E-03	54,4	
.v3	Injerto	Injerto + 78V	8,45E+04	2,92E-03	34,6	
.v4	Injerto + L1:D28R	Injerto + 78V	2,31E+05	3,14E-03	13,6	
.v5	Injerto + L1:M33V	Injerto + 78V	7,11E+04	2,42E-03	34,0	
.v6	Injerto + L2:N53Y	Injerto + 78V	1,23E+05	2,40E-03	19,5	4,01
.v7	Injerto + L2:L54R	Injerto + 78V			ND	
.v8	Injerto + L3:Y96F	Injerto + 78V			ND	
.v9	Injerto	Injerto + 78V + H1:F29R	2,64E+05	2,30E-03	9,0	
.v10	Injerto + L2:N53Y	Injerto + 78V + H3:S98Y	7,20E+04	1,97E-03	27,4	4,38
.v11	Injerto	Injerto + 78V + H3:S98Y			ND	
.v12	Injerto	Injerto + 78V + H2:T52aI	1,96E+05	2,18E-03	11,1	

Reevaluación de posiciones de marco – Se incorporaron cambios de marco adicionales en conjuntos. Las variantes se expresaron como IgG (variantes 13 a 16) y se examinaron mediante Biacore™ como se describe en la Tabla 3:

Tabla 3. Variantes de Marco 4F11 humanizadas Expresadas como IgG

Variante Hu4F11	Cadena Liviana	Cadena Pesada	Unión a p2S (Biacore™)		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
.v13	Injerto + M4L	Injerto + R71L, L78A	1,49E+05	1,86E-03	12,5
.v14	Injerto + M4L	Injerto + V2I, V48M, I69F, R71L, N73T, K75A, N76S, L78A, Y91F	1,41E+05	9,84E-04	7,0
.v15	Injerto	Injerto + R71L, L78A	9,05E+04	2,76E-03	30,5
.v16	Injerto	Injerto + V2I, V48M, I69F, R71L, N73T, K75A, N76S, L78A, Y91F	9,81E+04	1,65E-03	16,8
ch4F11			2,15E+05	7,92E-04	3,7

De estos, 4F11.v14 tuvo la mejor afinidad relativa a mu4F11.

Genotecas Limitadas – Se generaron dos genotecas limitadas basadas en 4F11.v13 como patrón. La genoteca 1 contenía los mismos cambios de marco que 4F11.V13 (LC:M4L y HC: R71L, L78A) mientras que la genoteca 2 contenía cambios adicionales en la cadena pesada: N76S y Y91F (**Figuras 10 y 11**). También se incorporaron los cambios CDR en L1 y L3 (D28S y D94E) en ambas genotecas. La diversificación se limitó a posiciones donde los cambios habían sido observados previamente luego de la selección de SPLs (**Figuras 10 y 11**). Estas posiciones (53 y 54 en la cadena liviana y 29, 52, 98 en la cadena pesada) se diversificaron para incluir los veinte aminoácidos y se panearon en relación al péptido p2S inmovilizado que se capturó mediante la utilización de NeutrAvidin inmovilizado, tal como se describe en la **Tabla 4**:

Tabla 4. Condiciones de Selección de fago de la Genoteca Limitada

	Selección Kon		Selección Koff	
	Antígeno	Tiempo de Unión	Exceso de Péptidos	Captura
Ronda 1	b-p2S inmovilizado (50 nM en NeutrAvidin®)	1 hora	Ninguno	–
Ronda 2	b-p2S inmovilizado (50 nM en NeurAvidin®)	1 hora	Ninguno	–
Ronda 3	50 nM b-p2S en solución	60 min	30 min, r.t.	10 min
Ronda 4	10 nM b-p2S en solución	30 min	1 hr; 37°C	5 min
Ronda 5	10 nM b-p2S en solución	15 min	2 hr; 37°C	5 min

La preferencia por residuos de amino ácidos diferentes en posiciones aleatorias para cada genoteca se muestra en la **Figura 12**. En una cadena liviana, ambas genotecas seleccionaron preferentemente 53Y y 54R, mientras que en la cadena pesada hubo una preferencia por 29F y 52T. En el CDR-H3 de la cadena pesada, se seleccionaron 3 aminoácidos en la posición 98 (98Y, 98H, y 98R) en ambas genotecas. Para identificar la mejor combinación de estos cambios, se construyeron las variantes 17 a 26 (**Tabla 5**), se expresaron y caracterizaron como IgG. Varias variantes tuvieron afinidades tan buenas como ch4F11 o mejores. Las variantes luego se caracterizaron en el ensayo de migración de células mediante la utilización del EGFL7 humano o de ratón (**Tabla 5 y Figura 13 y 14**).

Tabla 5. Variantes 4F11 humanizadas expresadas como IgG

Variante Hu4F11	Posición en la Cadena Liviana		Posición en la Cadena pesada			Marco VH utilizado	Unión a p2S (Biacore™)	Ensayo de Adhesión de Células (EGFL7 humano)
	53	54	29	52	98		Cambio de pliegues en KD (variante/quimera)	Variante/ch4F11 (pliegue)
ch4F11	N	L	F	T	S		1	1,00
.v17	Y	R	F	T	Y	Genoteca 1	0,93	0,86
.v18	Y	R	F	T	R	Genoteca 1	1,81	1,86
.v19	Y	R	G	T	R	Genoteca 1	1,43	12,87

.v20	Y	R	F	T	H	Genoteca 1	1,79	0,70
.v21	Y	L	R	T	R	Genoteca 1	1,31	3,12
.v22	Y	R	F	T	Y	Genoteca 2	1	0,81
.v23	Y	R	F	T	R	Genoteca 2	3,88	nd
.v24	Y	R	G	T	R	Genoteca 2	0,48	2,52
.v25	Y	R	F	T	H	Genoteca 2	0,56	1,82
.v26	Y	L	R	T	R	Genoteca 2	0,66	1,38

Los dominios VL y VH de hu4F11.v17 y 4F11.v22 comparados al mu4F11 y 4F11.v1 se muestran en las **Figuras 15 y 16**, respectivamente.

Ejemplo 2: Generación de Anticuerpos mu18F7 humanizados

El presente ejemplo muestra la humanización del anticuerpo murino 18F7 (mu18F7) dirigido contra EGFL7. Los números de residuo son acordes a Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5ta Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se utilizan abreviaturas de aminoácidos de una sola letra.

Materiales y Métodos

Se expresaron EGFL7 humano de longitud completa y una forma truncada de EGFL7 humano (residuos 1-182) que contienen los dominios EMI y 2 EGF (sin los 2 dominios de doble alfa hélice) en células CHO y se purificaron mediante medios convencionales (**Figura 1**). Los péptidos que contienen el epítope 18F7 en el EGFL7 llamado p5 (RACSTYRTIYRTA; SEC ID Nº: 7) y EMI1 (LTTCDGHRACSTYRTIYRTAYRRSPG; SEC ID Nº: 3) se realizaron en forma sintética.

Un hibridoma que expresa el anticuerpo murino 4F11 se obtuvo mediante la inmunización de los ratones knockout *Egfl7* con proteínas de EGFL7 recombinante humano de longitud completa expresadas en *E. coli* y se replegaron. Se monitorearon los anticuerpos con ELISA a través de placas recubiertas de EGFL7 recombinante humano o murino. Se identificó un panel de anticuerpos de bloqueo de funciones por su habilidad para bloquear la adhesión HUVEC a las placas recubiertas de EGFL7. Se identificaron varios anticuerpos como anticuerpos con

función de bloqueo de especies cruzadas, con la inclusión de una designada 18F7 (ver Solicitud de Patente Internacional conjunta WO 2007/106915, presentada el 16 de marzo de 2007 y publicada el 20 de Septiembre de 2007).

Clonación de dominios variables 18F7 murino y generación de un anticuerpo 18F7 quimérico – Se extrajo el total del ARN de las células de hibridoma que producían 18F7 mediante el uso de métodos estándar. Se amplificaron los dominios de variable liviana (VL) y variable pesada (VH) mediante el uso de RT-PCR con cebadores degenerativos a las cadenas pesadas y livianas. Los cebadores directos eran específicos para la secuencia del aminoácido N-terminal de las regiones VL y VH. Respectivamente, los cebadores inversos LC y HC se designados para alinearse a una región en el dominio liviano constante (CL) y el dominio 1 pesado constante (CH1), que están altamente conservados entre las especies. Se clonaron VL y VH amplificados en vectores de expresión mamífera para generar un anticuerpo ch18FT quimérico. Se determinó la secuencia del polinucleótido de las inserciones mediante métodos de secuenciamiento de rutina.

Injertos directos de región hipervariable en el marco de consenso del receptor humano – El fagémido utilizado para este trabajo es un vector de muestra monovalente Fab-g3 y consiste en 2 marcos de lectura abierta bajo el control de un único promotor phoA. El primer marco de lectura abierto consiste en la secuencia de señal stII fusionada con los dominios VL y CH1 de la cadena liviana del receptor y el segundo consiste en la secuencia de señal stII fusionada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada del aceptante, seguida por la proteína P3 de capa de fago menor.

Para realizar los injertos de CDR, se injertaron las regiones hipervariables del mu18F7 en los marcos del aceptante de consenso huKI y huIII para generar el injerto CDR directo (18F7-injerto) (**Figuras 17 y 18**). En el dominio VL se injertaron las siguientes regiones al aceptante de consenso humano: posiciones 24-34 (L1; SEC ID Nº: 100), 50-56 (L2; SEC ID Nº: 101) y 89-97 (L3; SEC ID Nº: 102). En el dominio VH se injertaron las posiciones 26-35 (H1; SEC ID Nº: 103), 49-65 (H2; SEC ID Nº: 104) y 95-102 (H3; SEC ID Nº: 105). MacCallum et al. (MacCallum *et al. J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) han analizado las estructuras de cristal complejas del antígeno y del anticuerpo y descubrieron que la posición 49 de la cadena pesada es parte de la región de contacto por lo tanto resulta razonable incluir esta posición en la definición de CDR-H2 al humanizar los anticuerpos.

Se generó el injerto 18F7 fue generado mediante mutagénesis de Kunel como una prueba en fago como un IgG mediante la utilización de oligonucleótidos separados para cada región hipervariable. Se identificaron clones correctos mediante el secuenciamiento de ADN.

Interruptor de Marco – Para identificar las posiciones del marco importantes para la unión, se generó una genoteca de fago de interruptor de marco para ofrecer tanto el aminoácido murino como humano en la posición 87 en VL, y en las posiciones 48, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78 y 80 en VH. Estas posiciones se diversificaron tal como lo muestra la **Figura 19**, mediante mutagénesis de Kunkel mediante la utilización de 3 oligonucleótidos para mutar el 18F7- injerto que se utilizó como patrón.

Ramdonización de las regiones hipervaribles – Se introdujo la diversidad de secuencia completa en forma separada en cada posición en las regiones hipervariables del 18F7- injerto mediante mutagénesis de Kunkel para generar genotecas de posición única que se agruparon. Cada posición en cada región hipervariable de injerto 18F7 estaba distribuida en forma aleatoria a los 20 aminoácidos posibles mediante la utilización de oligonucleótidos que codifican NNS en las posiciones respectivas. Se realizaron múltiples genotecas cada una con 20 miembros con una posición única ubicaba dentro de una de las regiones hipervariables distribuidas en forma completamente aleatoria. Para cubrir cada posición en las regiones hipervariables, se generaron 76 genotecas y se combinaron en una “genoteca de posición única” (SPL) que abarca mutaciones únicas ubicadas a lo largo de cada posición hipervariable. Se introdujo un codón variable (TAA) en el medio de cada CDR para evitar la reselección de la secuencia de injerto CDR de tipo salvaje. Esto se alcanzó mediante la mutagénesis de Kunel y resultó en 6 plantillas diferentes para el 18F7- injerto – cada uno con un codón de stop introducido en un CDR diferente. Al generar la genoteca, los oligonucleótidos utilizados para introducir diversidad también repararon el codón de stop en el patrón correspondiente.

Generación de genotecas de fago –Los oligonucleótidos diseñados para introducir diversidad en las posiciones del marco o en cada región hipervariable, tal como se describió anteriormente, fueron fosforilados en forma separada en reacciones de 20 µl que contienen 660 ng de oligonucleótidos, 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 20 mM DTT, y 5 U de quinasa polinucleótida durante 1 h a 37°C.

Para generar la genoteca de interruptor del marco se agregaron en forma simultánea los 3 oligonucleótidos fosforilados dirigidos a introducir diversidad a la reacción de mutagénesis. Para la SPL, se realizaron 76 reacciones de mutagénesis de Kunel individuales en una placa de 96 pocillos PCR. A partir de las reacciones oligonucleótidas fosforiladas (arriba), se agregaron 2 µl a la plantilla de 300 ng Kunkel que contiene el codón de stop correspondiente en 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$ en un volumen final de 10 µl. Se recoció la mezcla a 90°C durante 2 min, a 50°C durante 5 min y luego se la enfrió en hielo. Luego se rellenó la plantilla alineada agregando 0,5 µl 10 mM ATP, 0,5 µl 10 mM dNTPs (10 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl 100 mM DTT, tapón 1 µl 10X TM (0,5 M Tris pH 7.5, 0.1 M $MgCl_2$), 80 U T4 ligasa, y 4 U T7 polimerasa en un volumen total de 20 µl durante 2 h a temperatura ambiente. Estos productos que se rellenaron y ligaron, se transformaron luego en células XL1-Blue, cultivadas en 0,5 ml de 2YT que contienen 5 µg/ml de tetraciclina y M13/KO7 fago ayudante (MOI 10) durante 2 hr a 37°C y luego se los reúne y transforma en 500 ml 2YT que contienen 50 µg/ml carbenicilina y se cultivan 16 h a 37°C.

Selecciones de fago –Se utilizaron múltiples formas de antígenos para las selecciones de fago. Se inmovilizaron (5 µg/ml) de ESFL7 de extensión completa o truncados en 50 mM de bicarbonato de sodio pH 9,6 en placas de microtitulación MaxiSorp™ (Nunc) durante toda la noche a 4°C. También se biotinilaron el EMI1 y los péptidos tanto a través de su cisteína libre (mediante la utilización de PEO_2-maleimida biotina; Pierce) o a través de la amina libre en su término amino (mediante la utilización de NHS-LC-biotina, Pierce). Para las reacciones de biotinilación, se utilizó un reactivo de biotina de doble exceso molar en el PBS. Se capturaron EMI1 biotinilado y péptidos p5 en NeutrAvidin® (2 µg/ml) que se habían inmovilizado en 50 mM de bicarbonato de sodio pH 9,6 en placas de microtitulación (Nunc) MaxiSorp™ durante toda la noche a 4°C. Se bloquearon todas las placas durante al menos 1 h mediante Blocker™ Casein (Pierce).

Su extrajeron fagos de las partículas flotantes del cultivo y suspendieron en PBS con 5% de leche en polvo y 0,05 % Tween™ 20 (PBSBT). Luego del agregado de la genoteca de fago y 1 h de incubación, los pocillos de microtitulación se lavaron en forma cuidadosa con PBS que contenía 0,05 % Tween™ 20 (PBST) y se eluyeron los fagos unidos mediante la incubación de pocillos con 20 mM HCl, 500 mM KCl durante 30 min. Se neutralizó el fago eluído con 1 M Tris, pH 8 y se amplificó mediante células XL1-Blue y fago ayudante

M13/KO7 y se cultivaron durante la noche a 37°C en 2YT, 50 µg/ml de carbenicilina. Las titulaciones de fago eluídas de un pocillo contenedor del blanco se compararon con las titulaciones del fago recuperado de un pocillo que no contiene el blanco para evaluar el enriquecimiento.

Se aumentó la exigencia de la selección tanto mediante la captura de fago que llevó a concentraciones decrecientes de péptido p5 biotinilado en una solución, seguido por la captura en NeutrAvidin® durante 10 min (selección dentro del índice) y mediante el aumento del tiempo de lavado y de la temperatura para permitir que el fago de unión débil se lave (selección fuera del índice).

Producción IgG – A fines del monitoreo, se produjeron variantes IgG inicialmente en 293 células. Los vectores con códigos VLy VH (25 µg) se transfectaron en 293 células mediante el sistema FuGENE®. Se mezclaron 500 µl de FuGENE® con 4,5 ml de medio DMEM que no contiene FBS y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregó cada cadena a esta mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y luego se transfirió a cinco matraces para la transfección durante la noche a 37°C en 5% de CO_2. Al día siguiente se removió el medio que contenía la mezcla de transfección y se remplazó con un medio de 23 ml PS04 con 0,1 ml/L de elementos de trazo (A0934) y 10 mg/L de insulina (A0940). Se incubaron las células por un período adicional de 5 días luego del cual se cultivó el medio a 1000 rpm durante 5 min y se esterilizó mediante un filtro de unión bajo en proteína de 0,22 µm. Las muestras se pueden almacenar a 4°C luego de agregar de 2,5 ml 0,1% PMSF por cada 125 ml de medio.

Determinaciones de Afinidad –Las determinaciones de afinidad se llevaron a cabo mediante una resonancia plasmón de superficial mediante un BIAcore^{TM}-2000. Se inmovilizó el EGFL7 truncado o el péptido p5 (aproximadamente 50 – 200 RU) en 10 mM de acetato de sodio pH 4,8 en un chip de sensor CM5. Se inyectaron variantes purificadas de IgG (mediante una dilución serial doble de 0,5 a 1000 nM en PBST) a una velocidad de flujo de 30 µL/min. Se analizó cada muestra con una asociación de 3 minutos y una disociación de 3,5 minutos. Luego de cada inyección se regeneró el chip usando 10 mM de glicina pH 1,7.

La respuesta de unión se corrigió mediante la sustracción de una célula de flujo de control de las células de flujo variante IgG. Se utilizó un modelo A 1:1 Languir de prueba simultánea de k_{on} y k_{off} para los análisis cinéticos.

Resultados y Explicación

Humanización de 18F7 – El marco aceptante humano usado para la humanización de 18F7 se basa en el dominio kappa I VL de consenso humano y el dominio de subgrupo III VH de consenso humano. Se identificó e injertó cada CDR para mu18F7 en el marco del receptor humano para generar un injerto CDR que puede ser probado como un Fab en el fago (**Figuras 17 y 18**).

Evaluación del Antígeno para la selección de fago – El epítope 18F7 en EGFL7 se mapeó para el primer dominio EMI y más específicamente a un péptido p5 que utiliza un análisis de competición Western blot (**Figura 1 y 20**). El fago que muestra el injerto 18F7 se unió al EGFL7 inmovilizado, de extensión completa y truncado, pero también se observó una unión de fago no específica mediante un fago de control (**Figura 21**). Por esta razón, se utilizaron para la selección de fagos los péptidos p5 y EMI1 que bloquean la unión del 18F7 al EGFL7 truncado. Se biotinilaron los péptidos tanto a través de su cisteína libre para generar p5c y EMI1c (mediante maleimida PEO_2-biotina; Pierce) o a través del amino libre en su término de amino para generar p5n y EMI1n (mediante NHS-LC-biotina, Pierce). Para evaluar la unión, se capturaron los péptidos biotinilados en pocillos de microtitulación cubiertos con NeutrAvidin®. Luego de 2 vueltas de selección en EGFL7 inmovilizado truncado, se utilizó la genoteca del fago de interrupción del marco para evaluar la unión a los péptidos EMI1 y p5 biotinilados capturados. El fondo de fago unió al p5n y EMI1n, pero no al p5c o EMI1c (**Figura 22**). La cantidad de fago capturada fue mayor cuando se utilizó una concentración de péptido biotinilado 50 nM para unirse al pocillo cubierto de NeutrAvidin®.

Luego de la selección por 2 rondas contra el EGFL7 inmovilizado truncado, se lavó la genoteca de interruptor de marco por dos rondas de selección de péptido p5n biotinilado inmovilizado. Se usó el análisis de secuencia de ADN de 96 clones de la última ronda para evaluar la importancia del aminoácido, en base a la abundancia, en cada posición del interruptor (**Figura 23).** La abundancia del aminoácido antes y después de cuatro rondas de selección sugirió que los cambios N73K y L78A llevan a una mejora de la unión. Aunque menos prominente, el L78V y V48I también lo hacen y luego se estudió el L78V.

Se exploraron los SPLs en un esfuerzo por identificar mejoras adicionales mediante el uso de 4 marcos derivados de los resultados de la genoteca de interruptor de marco. Los 4 marcos incluían el injerto CDR inicial (injerto 18F7), el injerto 18F7 con N73K (18F7.v2), el injerto 18F7 con N73K y L78A (18F7.v3), y el

injerto 18F7 con N73K y L78V (18F7.v4). Para cada marco, se generó un SPL en el cual cada posición en cada CDR se distribuyó aleatoriamente en forma individual a todos los aminoácidos posibles (un total de 76 genotecas, cada una de las cuales contiene 20 miembros agrupados en un SPL). Se usaron seis plantillas de ADN injerto 18F7 (que contiene codones de stop en los CDRs apropiados) para generar los cuatro SPLs. Se introdujeron los cambios de marco en las posiciones 73 y 78 en VH durante la generación de SPL mediante el uso de codificación de oligonucleótidos mutagénicos para los cambios de marco apropiados. De este modo, se mutaron en forma simultánea las posiciones del marco y del CDR individual. Se lavaron los cuatro SPLs por dos rondas contra el EGFL7 inmovilizado truncado seguido por 3 rondas de selección en el péptido p5n biotinilado soluble que fue capturado mediante la utilización de NeutrAvidin® inmovilizado, tal como se describe en la **Tabla 6**:

Tabla 6. Condiciones de Selección de fago SPL

	Selección Kon		Selección Koff	
	Antígeno	Tiempo de unión	Exceso de Péptido	Captura
Ronda 1	b-p5N inmovilizado (50 nM en NeutrAvidin®)	1 hora	Ninguno	–
Ronda 2	b-p5N inmovilizado (50 nM en NeurAvidin®)	1 hora	Ninguno	–
Ronda 3	20 nM b-p5N	30 min	3 horas	10 min
Ronda 4	5 nM b-p5N	30 min	4.5 horas; 37°C	10 min
Ronda 5	10 nM b-p5N	20 min	70 hras; 37°C	10 min

La rigurosidad de la selección se aumentó en forma gradual mediante la reducción de la concentración de péptido p5n biotinilado, reduciendo el tiempo destinado a la unión y aumentando el tiempo de lavado y la temperatura. Se observa la mayor recuperación de fago durante las 3 últimas rondas de selección con SPLs basados en 18F7.v3 y 18F7.v4.

Se recogieron los clones de la última ronda para el análisis de la secuencia de ADN. Se identificaron los cambios de secuencia individual en cada CDR (**Figura 24**). Los clones de genoteca SP más abundante tenían cambios en VL en la posición S89. Se incorporaron en el 18F7.v3 los cambios que aparecieron en forma más frecuente y en más de una genoteca SP. Estas variantes (.v5 a .v10),

el 18F7- injerto (.v1) y los cambios al marco VH (.v2, .v3 y .v4), se expresaron como IgG para el posterior análisis mediante Biacore™ (**Tablas 7 y 8**).

Tabla 7. Variantes de 18F7- injerto expresadas como IgG

Variantes de injerto hu18F7	Cadena Liviana	Cadena Pesada
.v1	Injerto	Injerto
.v2	Injerto	73K
.v3	Injerto	73K & 78A
.v4	Injerto	73K & 78V
.v5	L2:F55G	73K & 78A
.v6	L3:S89G	73K & 78A
.v7	L3:S89A	73K & 78A
.v8	L3:S89V	73K & 78A
.v9	Injerto	73K & 78A & H1:Y32K
.v10	Injerto	73K & 78A & H3:D100P

Tabla 8. Análisis Biacore™ de Variantes de injerto

Análisis Biacore de Variantes de 18F7

Sobre mEGFL7-CB a 37C

		ka (1/Ms/1e5)	kd (1/s*1e4)	KD (nM)
18F7 quimérico	n= 5	0,36 ± 0,16	0,96 ± 0,78	3,17 ± 3,48
18F7 V1		0,97	2,74	2,82
18F7 V2		1,10	1,98	1,81
18F7 V3		0,55	0,905	1,64
18F7 V4		0,50	2,08	4,15
18F7 V5		0,73	1,17	1,61
18F7 V6		0,50	0,204	0,408
18F7 V7		0,70	0,958	1,38
18F7 V8		0,98	1,99	2,04
18F7 V9		0,59	0,932	1,58
18F7 V10		1,60	1,95	1,22
18F7 V6A	n=2	0,55 ± 0,01	4,04 ± 0,00	7,29 ± 0,17
18F7 V6B	n=2	0,79 ± 0,25	1,74 ± 1,75	2,68 ± 3,06
18F7 V6C	n=2	0,36 ± 0,06	0,81 ± 0,36	2,40 ± 1,42
18F7 V6D		1,03	7,91	7.65
18F7 V6E		0,48	4,74	9,9
18F7 V6I		0,23	4,88	21,3
18F7 V6J		0,21	0,164	0,8
18F7 V6K		0,28	0,454	1,6

37C sobre P5 inmovilizado

		ka (1/Ms/1e5)	kd (1/s*1e4)	KD (nM)
18F7 quimérico	n=5	1,09 ± 0,30	5,44 ± 0,49	5,51 ± 2,46
18F7 V1		3,17	20	6,3
18F7 V2		4,58	11,9	2,59
18F7 V3		2,03	8,58	4,22
18F7 V4		1,82	13,2	7,27
18F7 V5		3,30	8,92	2,7
18F7 V6	n=3	1,21 ± 0,14	3,89 ± 0,71	3,21 ± 0,49
18F7 V7		2,51	7,18	2,87
18F7 V8		4,72	10,2	2,16
18F7 V9		2,28	7,63	3,35
18F7 V10		8,25	8,11	0,982
18F7 V6A	n=2	3,73 ± 0,91	13,70 ± 1,41	3,74 ± 0,52
18F7 V6B	n=2	1,96 ± 0,25	6,38 ± 1,82	3,22 ± 0,52
18F7 V6C	n=2	1,24 ± 0,28	5,02 ± 0,31	4,13 ± 0,66
18F7 V6D	n=2	3,13 ± 1,89	23,25 ± 5,59	9,77 ± 7,69
18F7 V6E		3,03	15,4	5,1
18F7 V6I		1,90	31,6	16,7
18F7 V6J		1,08	6,07	5,6
18F7 V6K		1,27	6,62	5,2

El análisis Biacore™ de éstas 10 variantes indicó que todas se unieron bastante bien al mEGFL7 inmovilizado o al péptido p5. El 18F7.v6 tuvo un índice de disociación más lento (kd) y fue efectivo en el ensayo de adhesión HUVEC (**Figura 25**).

Pulido de 18F7.v6 – Se eliminó el ácido iso-aspártico potencial que fomar sitios (Asn-Gly) en CDR-L1 (N28,G29) y CDR-H2 (N54, G55) en 18F7.v6 mediante la prueba de amino ácidos alternativos en estas posiciones (**Tabla 9)**.

Tabla 9. Variantes Examinadas para eliminar Sitios Formadores de ácido iso-aspártico

Variantes hu18F7.v6	Cadena Liviana (N28 & G29)	Cadena Pesada (N54 & G55)
.v6A	L1:SG	.v6
.v6B	.v6	H2:SG
.v6C	.v6	H2:NS
.v6D	L1:SG	H2:SG
.v6E	L1:SG	H2:NS
.v6I	L1:QG	H2:NS
.v6J	L1:NS	H2:NS
.v6K	L1:NA	H2:NS

Una secuencia SG en H2 (.v6B y .v6D) expresada pobremente, mientras que la secuencia en L1 (.v6A) aumentó el índice de disociación. En contraste, una secuencia NS en H2 (.v6C) tiene poco efecto sobre la cinética (**Tablas 8 y 9**).De los otros cambios mostrados en L1 junto con H2:NS (.v6C), los cambios NS (.v6J) y NA (.v6K) tuvieron un efecto mínimo en el índice de disociación (**Tabla 8 y 9, Figura 25**). Estos cambios se pueden usar para mejorar la estabilidad de18F7.v6 mientras que mantienen las propiedades biológicas deseadas en comparación con 18F7 murino (**Figuras 25 y 26**). En las **Figuras 27 y 28,** respectivamente, se muestran los dominios VL y VH del hu18F7.v6K.

Ejemplo 3: Tratamiento de ratones portadores de tumores o ratones neonatales con anticuerpo anti-EGFL7 humanizado

Investigamos la habilidad de humanizar los anticuerpos anti-EGFL7 de la invención (solos y en combinación con la terapia anti-VEGF) para inhibir la angiogénesis y/o el crecimiento del tumor en una variedad de modelos. Observamos que los anticuerpos anti-EGFL7 mejoran la eficacia de la terapia anti-VEGF.

Se inyectó a ratones nu/nu HRLN hembras en forma subcutánea con células tumorales de cáncer de pulmón de células no pequeñas humana $1x10^7$

H1299 de y se les permitió a los tumores desarrollarse hasta alcanzar 80-120 mm^3. Los ratones portadores de tumores fueron separados en forma aleatoria en cuatro grupos (12 ratones cada uno) para que el tamaño promedio de tumor en cada grupo fuera de 122 mm^3. Estos ratones se trataron luego de la siguiente manera: Grupo 1: inyección intraperitoneal (ip) de anticuerpo anti-VEGF (B20-4.1; WO2005/012359 y WO2005/044853), una vez por semana a 10 mg/kg; Grupo 2: inyección ip de un anticuerpo de control negativo anti-ambrosía IgG una vez por semana a 10 mg/kg y anticuerpo anti-EGFL7 (hu18F7.v6K) dos veces por semana a 10 mg/kg; Grupo 3: inyección ip de B20-4,1 una vez por semana a 10 mg/kg y hu18F7.v6K dos veces por semana a 10 mg/kg; Grupo 4: sin tratamiento. Los tumores se midieron dos veces por semana con un calibre y se calcularon los volúmenes del tumor como (w^2 x l)/2 (w = ancho del tumor en mm, l = largo del tumor en mm). Se sacrificó a los ratones cuando sus tumores alcanzaban los 1000 mm^3 (definidos como “ratones que alcanzaron el punto final”). Se determinaron los volúmenes de tumor promedio de grupo +/- SEM en relación el tiempo hasta que ≥ 50% de los ratones alcanzaron el punto final. Los datos de este experimento muestran que ni el tratamiento sólo con B20.4-1 ni con hu18F7.v6K reducen en forma significativa el crecimiento del tumor sobre el control no tratado, aunque el tratamiento con hu18F7.v6K mostró una tendencia hacia la reducción del crecimiento (Figura 29). En contraste, el tratamiento con B20.4-1 y hu18F7.v6K inhibió en forma significativa el crecimiento del tumor. (Figura 29).

Se inyectó a los ratones sin pelo Balb-c en forma subcutánea en el costado derecho con células de carcinoma 5 x 10^6 HM7 en 0,1 ml Matrigel™. Cuando el tamaño de tumor promedio alcanzó el tamaño 80-150 mm^3, se separó a los animales en 4 grupos de 10 ratones cada uno para que los tamaños de tumor promedio en todos los grupos sea aproximadamente igual y se los trató de la siguiente manera: Grupo 1: inyección ip de IgG anti-ambrosía dos veces por semana a 5 mg/kg; Grupo 2: inyección ip de B20-4.1.1 (PCT/US2008/013248) dos veces por semana a 5 mg/kg; Grupo 3: inyección ip de anticuerpo anti-EGFL7 (hu18F7.v6k) dos veces por semana a 10 mg/kg; Grupo 4: inyección ip de B20-4.1.1 dos veces por semana a 5 mg/kg y hu18F7.v6k dos veces por semana a 10 mg/kg. Se midieron los tumores dos veces por semana con un calibre y se registró el ancho y el largo. Sacrificaron a los ratones cuando los tumores superaban los 1000 mm^3 o cuando el crecimiento del tumor o la ulceración

interfería con la salud del animal. Observamos que los tumores en los Grupos 1 y3 tenían índices de crecimiento similares, mientras que los tumores del Grupo 2 crecieron en forma más lenta que aquellos en el Grupo 1 y los tumores en el Grupo 4 mostraron un crecimiento negativo.

Se inyectó a los ratones sin pelo Balb-c en forma subcutánea en el costado derecho con células humanas primarias de explantes tumorales de cáncer de pulmón (LXFL 1674). El experimento comprendía un grupo de referencia (Grupo 1) dosificado con anticuerpos de control de IgG humano (hIgG) e IgG murino (mIgG), un Grupo 2 que recibió hu18F7.v6k y mIgG, un Grupo 3 que recibió B20-4.1.1 y hIgG, y un Grupo 4 que recibió hu18F7.v6K y B20-4.1.1. Todos los tratamientos recibieron ip dos veces por semana con hu18F7.v6k (o hIgG) dados a 10 mg/kg/dosis cuatro horas antes de administrar B20 (o mIgG) a 5 mg/kg/dosis. Se sacrificó a los ratones en forma individual cuando el volumen del tamaño excedió los 2000 mm^3. Se evaluó la eficacia de los grupos mientras que más del 50% de los ratones de control del Grupo 1 estaban vivos (día 14). El tamaño del grupo al comienzo del dosaje era de 10 ratones portadores de un tumor de entre 5-10 mm de diámetro por ratón. La ventaja de la terapia de combinación sobre la monoterapia B20-4.1.1 fue significativa en términos estadísticos. (Figura 30).

También examinamos el anticuerpo humanizado anti-EGFL7 hu18F7.v6k y su anticuerpo 18F7 murino en un ensayo de angiogénesis de órgano neonatal murino. Se inyectó a los ratones recién nacidos con anticuerpos los días 1 y 3 después del nacimiento y se cultivaron los órganos en el día 5. Se tiñeron las vasculaturas en órganos múltiples con un marcador de célula endotelial vascular CD31 y se cuantificaron las densidades vasculares. Los grupos eran: Grupo 1 que recibió 15 mg/ml de anticuerpo anti-ambrosía (n=3/experimento), Grupo 2 que recibió 5 mg/ml de anticuerpo anti-VEGF (G6.31; WO2005/012359 y WO2005/044853; n=3/experimento) y 10 mg/ml de anticuerpo de ambrosías, Grupo 3 que recibió 5 mg/ml G6.31 y 10 mg/ml murino 18F7 (n=4/experimento), y Grupo 4 que recibió 5 mg/ml G6.31 y 10 mg/ml hu18F7.v6k (n=4/experimento). Se muestran los resultados reunidos de los tres experimentos independientes en la Figura 31, que demostraron que el anticuerpo anti-VEGF G6.31 tiene actividad anti-angiogénesis significativa, y la combinación de G6.31 con hu18F7.v6k o con 18F7 murino mejorada en forma significativa con la actividad de G6.31. Se observaron actividades de anti-angiogénesis similares en la vellosidad intestinal de

la vasculatura. Estos resultados confirman que el hu18F7.v6k y 18F7 murino tienen actividades de anti-angiogénesis similares en este modelo.

Ejemplo 4: Inhibición de permeabilidad y perfusión de tumor mediante anticuerpos anti-EGFL7 en sujetos humanos

Llevamos a cabo evaluaciones de imagen de resonancia magnética con contraste dinámica (DCE-MRI, por sus siglas en inglés) en sujetos humanos a los que se les había administrado con dos ciclos de 3 mg/kg o 15 mg/kg hu18F7.v6k para explorar cambios en vasculatura de tumor en respuesta al anticuerpo. DCE-MRI es una modalidad de imagen que permite el análisis funcional de microcirculación de tumor. Los cambios en los parámetros vasculares, como V_e, el volumen de pérdida extracelular y extravascular fraccional, y K_{trans}, la constante de transferencia de volumen, refleja cambios en la permeabilidad y perfusión de tumor. Los dos escaneos previos al tratamiento de línea de base se obtuvieron aproximadamente con 5-7 días de diferencia (pero al menos con 24 horas de diferencia) con anterioridad a la dosificación en el Ciclo 1 (por ejemplo, Día -1 y Día -7 relativos a la administración del anticuerpo). Los escaneos posteriores al tratamiento se obtuvieron en el Día 15 del Ciclo 1 y el Día 8 del Ciclo 2 (± 2 días para permitir organizar las dificultades). Las lesiones metásticas evauables tenían que medir ≥3 cm en el hígado, o ≥2 cm en otra parte en al menos una dimensión. Además de las secuencias de adición de DCE-MRI, otras secuencias de adquisición de MRI, por ejemplo, se adquirieron imágenes potencias por difusión de imágenes potenciadas T1- y T2 se adquirieron durante la visita de adquisición de imagen para cada sujeto. Como se muestra en la Tabla 10, observamos que el tratamiento con anticuerpos anti-EGFL7 redujeron K_{trans} en algunos tumores sólidos por hasta aproximadamente 40%.

Tabla 10. K_{trans} Promedio

Identificador de Patente, volumen de tumor de hígado, y dosificación de hu18F7.v6k	Base 1	Base 2	Ciclo 1, Día 15	Ciclo 2, Día 8
3301, 82 cc (3 mg/kg)	ND	0,021	0,0171	ND
3503, 7 cc (15 mg/kg)	ND	0,0542	0,0435	0,0327
3505, 11 cc (15 mg/kg)	0,0278	0,0288	0,0239	0,019

3505, 142 cc (15 mg/kg)	0,0239	0,022	0,0229	0,02
3902, 235 cc (3 mg/kg)	0,022	0,019	0,02	0,022

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. et al.

<120> ANTICUERPOS ANTI-EGFL7 HUMANIZADOS Y METODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> P4328R1 WO

<140>

<141>

<150> 61/176,817

<151> 2009-05-08

<160> 233

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 278

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Met Gln Thr Met Trp Gly Ser Gly Glu Leu Leu Val Ala Trp Phe Leu

1 5 10 15

Val Leu Ala Ala Asp Gly Thr Thr Glu His Val Tyr Arg Pro Ser Arg

20 25 30

Arg Val Cys Thr Val Gly Ile Ser Gly Gly Ser Ile Ser Glu Thr Phe
35 40 45

Val Gln Arg Val Tyr Gln Pro Tyr Leu Thr Thr Cys Asp Gly His Arg
50 55 60

Ala Cys Ser Thr Tyr Arg Thr Ile Tyr Arg Thr Ala Tyr Arg Arg Ser
65 70 75 80

Pro Gly Val Thr Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Ala Cys Cys Pro Gly Trp
85 90 95

Lys Arg Thr Ser Gly Leu Pro Gly Ala Cys Gly Ala Ala Ile Cys Gln
100 105 110

Pro Pro Cys Gly Asn Gly Gly Ser Cys Ile Arg Pro Gly His Cys Arg
115 120 125

Cys Pro Val Gly Trp Gln Gly Asp Thr Cys Gln Thr Asp Val Asp Glu
130 135 140

Cys Ser Thr Gly Glu Ala Ser Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Val
145 150 155 160

Gly Ser Tyr Trp Cys Gln Gly Trp Glu Gly Gln Ser Pro Ser Ala Asp
165 170 175

Gly Thr Arg Cys Leu Ser Lys Glu Gly Pro Ser Pro Val Ala Pro Asn
180 185 190

Pro Thr Ala Gly Val Asp Ser Met Ala Arg Glu Glu Val Tyr Arg Leu
195 200 205

Gln Ala Arg Val Asp Val Leu Glu Gln Lys Leu Gln Leu Val Leu Ala
210 215 220

Pro Leu His Ser Leu Ala Ser Arg Ser Thr Glu His Gly Leu Gln Asp
225 230 235 240

Pro Gly Ser Leu Leu Ala His Ser Phe Gln Gln Leu Asp Arg Ile Asp
245 250 255

Ser Leu Ser Glu Gln Val Ser Phe Leu Glu Glu His Leu Gly Ser Cys
260 265 270

Ser Cys Lys Lys Asp Leu

275

<210> 2

<211> 274

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Gly Ser Gln Glu Val Leu Leu Met Trp Leu Leu Val Leu Ala

1 5 10 15

Val Gly Gly Thr Glu His Ala Tyr Arg Pro Gly Arg Arg Val Cys Ala

20 25 30

Val Arg Ala His Gly Asp Pro Val Ser Glu Ser Phe Val Gln Arg Val

35 40 45

Tyr Gln Pro Phe Leu Thr Thr Cys Asp Gly His Arg Ala Cys Ser Thr

50 55 60

Tyr Arg Thr Ile Tyr Arg Thr Ala Tyr Arg Arg Ser Pro Gly Leu Ala

65 70 75 80

Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Ala Cys Cys Pro Gly Trp Lys Arg Thr Ser
85 90 95

Gly Leu Pro Gly Ala Cys Gly Ala Ala Ile Cys Gln Pro Pro Cys Arg
100 105 110

Asn Gly Gly Ser Cys Val Gln Pro Gly Arg Cys Arg Cys Pro Ala Gly
115 120 125

Trp Arg Gly Asp Thr Cys Gln Ser Asp Val Asp Glu Cys Ser Ala Arg
130 135 140

Arg Gly Gly Cys Pro Gln Arg Cys Ile Asn Thr Ala Gly Ser Tyr Trp
145 150 155 160

Cys Gln Cys Trp Glu Gly His Ser Leu Ser Ala Asp Gly Thr Leu Cys
165 170 175

Val Pro Lys Gly Gly Pro Pro Arg Val Ala Pro Asn Pro Thr Gly Val
180 185 190

Asp Ser Ala Met Lys Glu Glu Val Gln Arg Leu Gln Ser Arg Val Asp
195 200 205

Leu Leu Glu Glu Lys Leu Gln Leu Val Leu Ala Pro Leu His Ser Leu

210 215 220

Ala Ser Gln Ala Leu Glu His Gly Leu Pro Asp Pro Gly Ser Leu Leu

225 230 235 240

Val His Ser Phe Gln Gln Leu Gly Arg Ile Asp Ser Leu Ser Glu Gln

245 250 255

Ile Ser Phe Leu Glu Glu Gln Leu Gly Ser Cys Ser Cys Lys Lys Asp

260 265 270

Ser Gly

<210> 3

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 3

Leu Thr Thr Cys Asp Gly His Arg Ala Cys Ser Thr Tyr Arg Thr Ile

1 5 10 15

Tyr Arg Thr Ala Tyr Arg Arg Ser Pro Gly

20 25

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 4

Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Ala Cys Cys Pro Gly Trp Lys Arg Thr Ser

1 5 10 15

Gly Leu Pro Gly Ala Cys Gly Ala Ala Ile Cys Gln Pro Pro

20 25 30

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 5

Arg Pro Arg Tyr Ala Cys Cys Pro Gly Trp Lys Arg Thr

1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 6

Leu Thr Thr Cys Asp Gly His Arg Ala Cys Ser Thr Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 7

Arg Ala Cys Ser Thr Tyr Arg Thr Ile Tyr Arg Thr Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 8

Arg Thr Ala Tyr Arg Arg Ser Pro Gly Val Thr Pro Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 9

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

100 105

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 11

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 12

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(39)

<400> 13

gcc tat gca gat atc cag atg acc cag tcc ccg agc tcc 39

Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 14

Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 15

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser

1 5 10

<210> 16

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucléotido Sintético"

<400> 16

gcctatcgag atatccagmt cacccagtcc ccgagctcc 39

<210> 17

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(39)

<400> 17

aca aac gcg tac gct gag gtt cag ctg gtg gag tct ggc 39

Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly

1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 18

Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly

1 5 10

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 19

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly

1 5

<210> 20

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético"

<400> 20

acaaacgcgt acgctgagrt ccagctggtg gagtctggc 39

<210> 21

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(36)

<400> 21

ggt aag ggc ctg gaa tgg gtt gca agg att tat cct 36

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro

1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 22

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro

1 5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 23

Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr

1 5 10

<210> 24

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético"

<400> 24

ggtaagggcc tggaatggrt ggcaaggatt tatcct 36

<210> 25

<211> 102

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido Sintético"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(102)

<400> 25

gtc aag ggc cgt ttc act ata agc cgc gac aac tcc aaa aac aca ctg 48

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu

1 5 10 15

tac cta caa atg aac agc gag gac act gcc gtc tat tat tgt agc cgc 96

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

20 25 30

tgg gga 102

Trp Gly

<210> 26

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 26

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Gly

<210> 27

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 27

Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala

1 5 10 15

His Leu Gln Ile Asn Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg

20 25 30

Leu Gly

<210> 28

<211> 102

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido Sintético"

<400> 28

gtcaagggcc gtttcactwt cagcckcgac amctccrmaa rcacarygta cctacaaatg 60

aacagcgagg acactgccgt ctattwctgt gcgcgtctgg gt 102

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 29

Arg Ser Pro Gly Leu Ala Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Ala

1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 30

Gly Trp Lys Arg Thr Ser Gly Leu Pro Gly Ala Cys Gly

1 5 10

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 31

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Ser

1 5 10 15

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 32

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 33

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 34

Gly His Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 35

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 36

Ala Arg Leu Gly Ser Ser Ala Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 37

Lys Arg Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Ser

1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 38

Lys Ala Ser His Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Ser

1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 39

Lys Ala Ser Gln Ser Gly Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Ser

1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 40

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Arg Gly Asp Ser Tyr Met Ser

1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 41

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Val Ser

1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 42

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Leu Gly Asp Ser Tyr Met Ser

1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 43

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Trp Gly Asp Ser Tyr Met Ser

1 5 10 15

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 44

Gly Ala Ser Tyr Leu Glu Ser

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 45

Gly Ala Ser Asn Arg Glu Ser

1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 46

Gly Ala Ser Asn Tyr Glu Ser

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 47

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Gln

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 48

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Phe Thr

1 5

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 49

Gly His Thr Gly Thr Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 50

Gly His Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Tyr Ser

1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 51

Gly His Thr Phe Asp Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 52

Gly His Thr Phe Arg Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 53

Gly Val Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 54

Gly His Arg Phe Thr Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 55

Gly His Thr Phe Gly Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 56

Gly His Thr Arg Thr Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 57

Gly His Thr Ser Thr Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 58

Gly Trp Ile Asn Trp His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 59

Gly Trp Ile Asn Met His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 60

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Met Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 61

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala His Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 62

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Xaa Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 63

Gly Trp Ile Asn Ile His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 64

Gly Trp Ile Asn Trp His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 65

Gly Trp Ile Asn Thr Arg Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 66

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 66

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Ile Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 67

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Ser Gly

<210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 68

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Thr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 69

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 69

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Thr Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 70

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 70

Gly Trp Ile Asn Ile His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 71

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Met Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 72

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 72

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Tyr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 73

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 73

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Arg

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 74

Ala Asn Leu Gly Ser Ser Ala Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 75

Ala Arg Leu Gly Ser Cys Ala Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 76

Ala Arg Leu Gly Ser Tyr Ala Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 77

Ala Arg Leu Gly Ser Ser Ala Val Asp Ala

1 5 10

<210> 78

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 78

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

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

Gly Asp Ser Tyr Met Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 79

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 79

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

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

Gly Asp Ser Tyr Met Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

Glu Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 80

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly His Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 81

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Gly Ser Ser Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 82

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Tyr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

Glu Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 83

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

Gly Asp Ser Tyr Met Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 84

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 84

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Gly Ser Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 85

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 85

Glu Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly His Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Ser Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 86

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 86

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 87

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 87

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 88

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His

1 5 10

<210> 89

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 89

Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His

1 5 10

<210> 90

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 90

gaagacttcg caacttatta ctgtagccag agcacccac 39

<210> 91

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 91

gaagacttcg caacttattw ctgtagccag agcacccac 39

<210> 92

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 92

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Asp Ile Asn Leu Asp

1 5 10

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 93

Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asn Leu Asp

1 5 10

<210> 94

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 94

ggtaagggcc tggaatgggt tggtgatatc aacctggat 39

<210> 95

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 95

ggtaagggcc tggaatggrt cggtgatatc aacctggat 39

<210> 96

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 96

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn

1 5 10 15

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

20 25

<210> 97

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 97

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

1 5 10 15

Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Thr

20 25

<210> 98

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 98

cagaaattca aaggtcgttt cactataagc cgcgacacct ccaaaaacac actgtaccta 60

caaatgaaca gcttaaga 78

<210> 99

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 99

cagaaattca aaggtcgtky cactmtcagc sktgacamgt ccarsarcac asygtacmtg 60

caaatgaaca gcttaaga 78

<210> 100

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 100

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 101

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 102

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 103

Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 104

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 104

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 105

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 105

Ala Arg Glu Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 106

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 106

Gln Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 107

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 107

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 108

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 108

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val Pro Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 109

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 109

Ser Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 110

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 110

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Leu Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 111

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 111

Leu Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 112

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 112

Arg Trp Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 113

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 113

Arg Pro Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 114

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 114

Arg Thr His Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 115

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 115

Arg Thr Ser Gln Ser Val Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 116

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 116

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Thr Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 117

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Leu Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 118

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 118

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Pro Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 119

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 119

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Gly

1 5 10 15

<210> 120

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 120

Thr Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 121

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 121

Leu Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 122

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 122

Arg Thr Ser Asp Ser Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 123

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 123

Arg Thr Ser Gln Gly Leu Val His Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 124

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 124

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 125

Arg Val Ser Asn Asp Phe Ser

1 5

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 126

Arg Val Ser Asn Arg Ile Ser

1 5

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 127

Arg Val Ser Asn Arg Thr Ser

1 5

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 128

Arg Val Ser Asn Arg Gly Ser

1 5

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 129

Arg Val Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 130

Ala Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 131

Gly Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 132

Leu Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 133

Ser Gln Ser Cys His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 134

Ser Gln Ser Thr Phe Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 135

Ala Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 136

Gly Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 137

Leu Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 138

Ala Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 139

Asn Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 140

Ala Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 141

Ile Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 142

Leu Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 143

Val Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 144

Thr Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 145

Lys Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 146

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 146

Gly Tyr Thr Val Ile Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 147

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 147

Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Tyr Tyr Ile Asn

1 5 10

<210> 148

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 148

Gly Tyr Asn Phe Ile Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 149

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 149

Gly Tyr Thr Phe Met Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 150

Gly Tyr Thr Phe Arg Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 151

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 151

Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 152

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 152

Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Gln Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 153

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 153

Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Lys Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 154

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 154

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Gly Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 155

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 155

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Lys Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 156

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 156

Gly Asp Ile Asn Leu Leu Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 157

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 157

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Arg Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 158

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 158

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Ile Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 159

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 159

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Gly His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 160

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 160

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 161

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 161

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Asn Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 162

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 162

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Gln

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 163

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 163

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Thr Gly

<210> 164

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 164

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys His

<210> 165

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 165

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 166

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 166

Gly Asp Ile Asn Ala Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 167

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 167

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Thr Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 168

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 168

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Ala Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 169

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 169

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Asn Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 170

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 170

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Val Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 171

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 171

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Arg

<210> 172

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 172

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Arg Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 173

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 173

Gly Asp Ile Asn Asn Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 174

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 174

Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 175

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 175

Gly Asp Ile Asn Leu Arg Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 176

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 176

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Tyr Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 177

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 177

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 178

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 178

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Arg Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 179

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 179

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Lys Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 180

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 180

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Val Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 181

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 181

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Ser Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 182

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 182

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Arg His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 183

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 183

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Val Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 184

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 184

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Ile Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 185

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 185

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Leu Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 186

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 186

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Arg

<210> 187

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 187

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 188

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 188

Asn Arg Glu Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 189

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 189

Thr Arg Glu Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 190

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 190

Ala Arg Glu Gly Val Tyr His Pro Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 191

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 191

Ala Arg Glu Gly Val Tyr His Pro Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 192

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 192

Ala Arg Glu Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Trp Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 193

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 194

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Val His Ile

20 25 30

Asn Ala Ile Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 195

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 195

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 196

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Leu Asp Asn Ser Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 197

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 198

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 199

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 199

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 200

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 201

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 202

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 203

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 204

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 205

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Arg"

<220>

<221> misc_característica

<222> (6)..(6)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Asn"

<220>

<221> misc_característica

<222> (8)..(8)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar="Leu"

<220>

<221> misc_caractarística

<222> (13)..(13)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 205

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 206

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 206

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 207

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 207

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 208

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 208

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 209

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 210

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar="Arg"

<220>

<221> misc_caractarística

<222> (2)..(2)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Gln"

<220>

<221> misc_caractarística

<222> (4)..(4)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> misc_caractarística

<222> (6)..(6)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar="Leu" o "Arg" o "Ser" o "Trp"

<220>

<221> misc_caractarística

<222> (9)..(9)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (14)..(14)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 210

Lys Ala Ser His Ser Gly Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Ser

1 5 10 15

<210> 211

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Tyr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="Arg" o "Tyr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (4)..(5)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia
con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> misc_característica

<222> (7)..(7)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 211

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Gln

1 5

<210> 212

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Glu"

<220>

<221> misc_característica

<222> (6)..(6)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Tyr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (8)..(8)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 212

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Phe Thr

1 5

<210> 213

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar="Thr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Gly" o "Arg" o "Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="Gly" o "Arg" o "Thr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (2)..(5)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar="Tyr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (9)..(9)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 213

Gly His Arg Phe Asp Thr Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 214

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="Met" o "Thr" o "Trp"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Arg"

<220>

<221> misc_característica

<222> (5)..(6)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar="Met" o "Thr" o "Tyr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (12)..(12)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

<223> /reemplazar="His"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15)..(15)

<223> /reemplazar="Met" o "Thr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> /reemplazar="Tyr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)..(18)

<223> /reemplazar="Arg"

<220>

<221> misc_característica

<222> (14)..(18)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia
con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 214

Gly Trp Ile Asn Ile His Ser Gly Val Pro Thr Ile Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 215

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar="Arg"

<220>

<221> misc_característica

<222> (2)..(2)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Ser" o "Tyr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (6)..(6)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar="Tyr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (10)..(10)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 215

Ala Asn Leu Gly Ser Cys Ala Val Asp Ala

1 5 10

<210> 216

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (2)..(2)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 216

Glu Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 217

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (13)..(13)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 217

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10

<210> 218

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Ile"

<220>

<221> misc_característica

<222> (4)..(4)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Arg"

<220>

<221> misc_característica

<222> (6)..(6)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Thr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (8)..(8)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar="Glu" o "Lys" o "Thr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> misc_característica

<222> (10)..(11)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia
con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar="Leu" or "Met" or "Thr" or "Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (13)..(13)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia
con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> /reemplazar="Tyr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (29)..(29)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 218

Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Asn Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 219

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 219

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 220

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Arg"

<220>

<221> misc_característica

<222> (6)..(6)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar="Leu" or "Met" or "Thr" or "Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (13)..(13)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 220

Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 221

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 221

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 222

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar="Gln" o "Arg" o "Ser" o "Thr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar="Thr" o "Trp"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Gln"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(6)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Pro"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar="Leu" o "Pro" o "Thr" o "Tyr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar="Gln" o "Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar="Gly" o "Ser"

<220>

<221> misc_característica

<222> (8)..(11)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia
con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (16)..(16)
<223> /reemplazar="His"

<220>
<221> misc_característica
<222> (16)..(16)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia
con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 222
Leu Pro His Asp Gly Leu Val His Ile Asn Ala Ile Thr Tyr Leu Gly
1 5 10 15

<210> 223
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="Arg"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Gly" o "Phe" o "Ile" o "Thr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (5)..(6)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia
con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 223

Arg Val Ser Asn Asp Ala Ser

1 5

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar="Gly" o "Ile" o "Lys" o "Leu" o "Asn" o

"Ser" o "Thr" o "Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(1)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Thr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="His"

<220>

<221> misc_característica

<222> (4)..(5)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 224

Ala Gln Ser Cys Phe Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 225

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar="Thr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="Met" o "Arg" o "Ser"

<220>

<221> misc_característica

<222> (3)..(5)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia
con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar="Gln" o "Lys"

<220>

<221> misc_característica

<222> (7)..(7)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia
con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar="Met"

<220>

<221> misc_característica

<222> (9)..(9)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia
con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 225

Gly Tyr Asn Phe Ile Asp Tyr Tyr Ile Asn

1 5 10

<210> 226

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="Leu" o "Asn" o "Pro"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Leu" o "Arg"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar="Lys" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Tyr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar="Ile" o "Lys" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Val"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar="Arg" o "Thr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (5)..(10)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar="Val" o "Tyr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

<223> /reemplazar="Asn" o "Gln"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15)..(15)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> /reemplazar="Gln"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

<223> /reemplazar="Thr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)..(18)

<223> /reemplazar="His" o "Arg" o "Ser"

<220>

<221> misc_característica

<222> (12)..(18)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 226

Gly Asp Ile Asn Ala Asp Gly Gly Gly Gly His Ile Asn Ala Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 227

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar="Asn" o "Thr"

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(1)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Pro"

<220>

<221> misc_característica

<222> (8)..(8)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

<223> /reemplazar="Trp"

<220>

<221> misc_característica

<222> (14)..(14)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 227

Ala Arg Glu Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 228

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (13)..(13)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 228

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10

<210> 229

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar="Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (2)..(2)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Leu"

<220>

<221> misc_característica

<222> (4)..(4)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="Arg" o "Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (6)..(6)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Asn"

<220>

<221> misc_característica

<222> (8)..(8)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar="Asn" o "Arg" o "Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> misc_característica

<222> (10)..(11)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar="Leu" o "Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (13)..(13)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15)..(15)

<223> /reemplazar="Met"

<220>

<221> misc_característica

<222> (15)..(15)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<400> 229

Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 230

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Lys"

<220>

<221> misc_característica

<222> (8)..(8)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar="Leu" o "Val"

<220>

<221> misc_característica

<222> (13)..(13)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia

con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 230

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 231

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 231

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 232

<211> 6

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de lo desconocido: Secuencia eucariota"

<220>

<221> base_modificada

<222> (2)..(2)

<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 232

cncaat 6

<210> 233

<211> 6

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de lo desconocido: Secuencia eucariota"

<400> 233

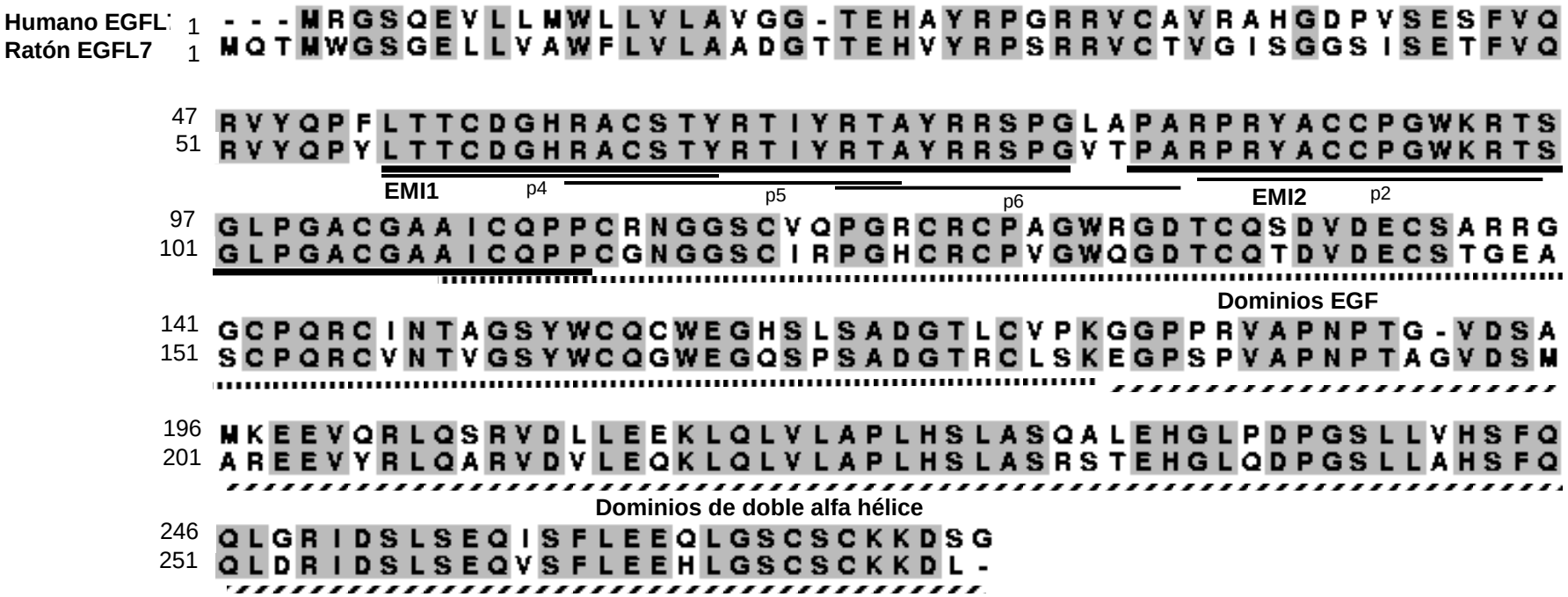
aataaa 6

RESUMEN

La presente invención se relaciona con anticuerpos a EGFL7 y usos de los mismos.

Figura 1

Secuencias de Aminoácidos de EGFL7 de humano y ratón



Péptidos EMI2 y p2 son capaces de prevenir la unión de 4F11 a proteína de EGFL7 recombinante truncado.
La proteína de huEGFL7 truncado contiene las posiciones Metionina 1 - Prolina 182
La proteína de muEGFL7 truncado contiene las posiciones Metionina 1 - Prolina 186
Los péptidos EMI1 and EMI2 se subrayan con líneas gruesas,los péptidos p2, p4, p5 y p6 péptidos se subrayan con líneas finas.

Figura 2

Dominio Liviano Variable 4F11

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
																								Kabat - CDR L1																				
																								Chothia - CDR L1																				
																																				Contacto - CDR L1								
huKI	**D**	**I**	**Q**	**M**	**T**	**Q**	**S**	**P**	**S**	**S**	**L**	**S**	**A**	**S**	**V**	**G**	**D**	**R**	**V**	**T**	**I**	**T**	**C**	**R**	**A**	**S**	**Q**							**S**	**I**	**S**	**N**	**Y**	**L**	**A**	**W**	**Y**	**Q**
mu4F11	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			D	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q
hu4F11.v1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			D	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q

Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
															Kabat - CDR L2																													
															Chothia - CDR L2																														
																				Contacto - CDR L2																									
huKI	**Q**	**K**	**P**	**G**	**K**	**A**	**P**	**K**	**L**	**L**	**I**		**Y**	**A**	**A**	**S**	**S**	**L**	**E**	**S**	**G**	**V**	**P**	**S**	**R**	**F**	**S**	**G**	**S**	**G**	**S**	**G**	**T**	**D**	**F**	**T**	**L**	**T**	**I**	**S**	**S**	**L**	**Q**	**P**
mu4F11	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	N	L	E	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H	P	V	E	E
hu4F11.v1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
									Kabat - CDR L3																									
									Chothia - CDR L3																									
									Contacto - CDR L3																									
huKI	**E**	**D**	**F**	**A**	**T**	**Y**	**Y**	**C**	**Q**	**Q**	**Y**	**N**	**S**	**L**	**P**							**W**	**T**	**F**	**G**	**Q**	**G**	**T**	**K**	**V**	**E**	**I**	**K**	**R**
mu4F11	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	E	D	P							Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R
hu4F11.v1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	E	D	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

Figura 3

Dominio Pesado Variable 4F11

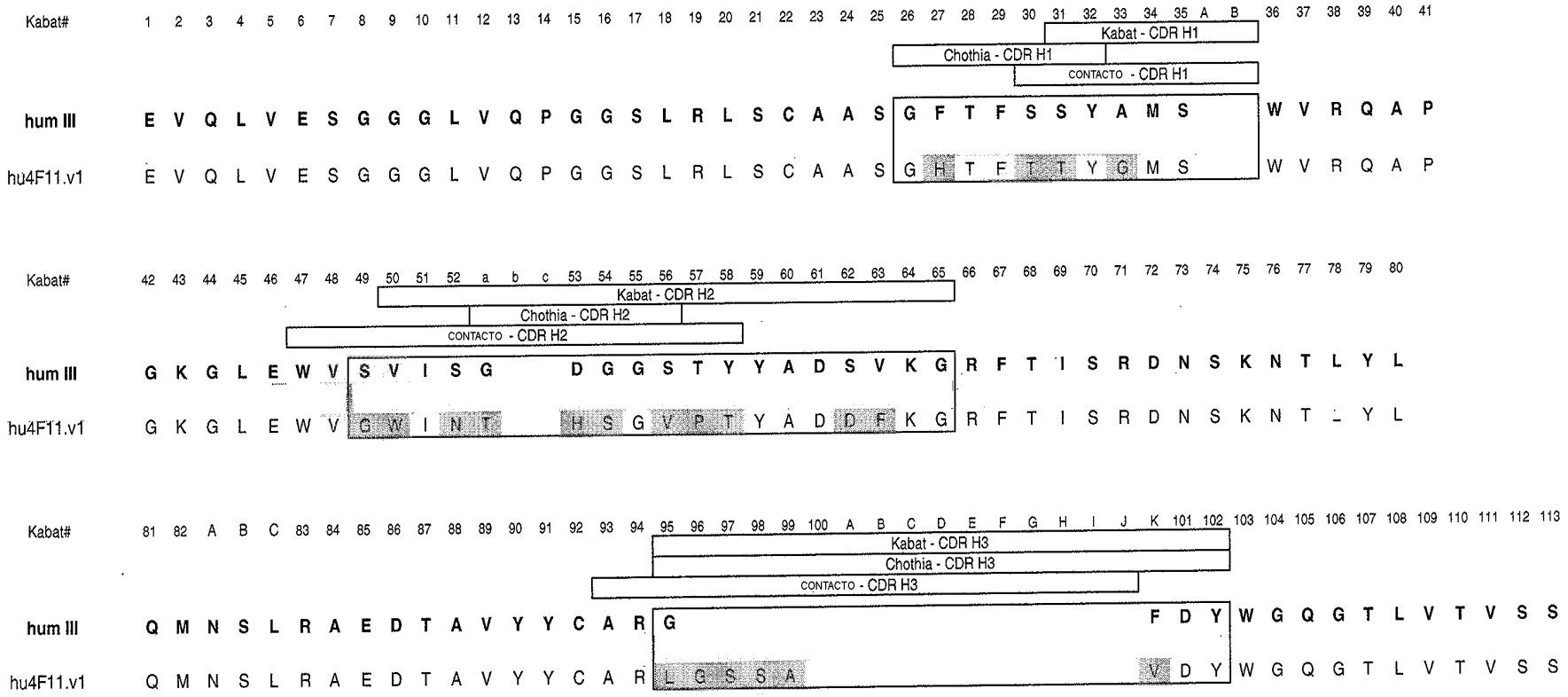


Figura 4

Diseño de Oligonucleótido para la Genoteca de Interruptor de Marco

VL- marco región 1

			1				5					10	
GCC	TAT	GCA	GAT	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCC	CCG	AGC	TCC	(13)
A	Y	A	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	(14)
4F11			D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	(15)
GCC	TAT	GCA	GAT	ATC	CAG	MTC	ACC	CAG	TCC	CCG	AGC	TCC	(16)

VH- marco región 1

					1				5				
ACA	AAC	GCG	TAC	GCT	GAG	GTT	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGC	(17)
T	N	A	Y	A	E	V	Q	L	V	E	S	G	(18)
					Q	I	Q	L	V	Q	S	G	(19)
ACA	AAC	GCG	TAC	GCT	GAG	RTC	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGC	(20)

VH- marco región 2

			45					50		52	52	
GGT	AAG	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	GCA	AGG	ATT	TAT	CCT	(21)
G	K	G	**L**	E	**W**	V	A	R	I	Y	P	(22)
G	K	G	**L**	K	**W**	M	G	W	I	N	T	(23)
GGT	AAG	GGC	CTG	GAA	TGG	RTG	GCA	AGG	ATT	TAT	CCT	(24)

VH- marco región 3

		65					70					75					80		82	82	82		
GTC	AAG	GGC	CGT	TTC	ACT	ATA	AGC	CGC	GAC	AAC	TCC	AAA	AAC	ACA	CTG	TAC	CTA	CAA	ATG	AAC	AGC		
V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S		
F	K	G	R	F	A	F	S	L	E	T	S	A	S	T	A	H	L	Q	I	N	N		
GTC	AAG	GGC	CGT	TTC	ACT	WTC	AGC	CKC	GAC	AMC	TCC	RMA	ARC	ACA	RYG	TAC	CTA	CAA	ATG	AAC	AGC		
												+TE			+VP								

85					90				95			
GAG	GAC	ACT	GCC	GTC	TAT	TAT	TGT	AGC	CGC	TGG	GGA	(25)
E	D	T	A	V	Y	**Y**	C	**S**	R	**W**	G	(26)
E	D	T	A	T	Y	F	C	A	R	L	G	(27)
GAG	GAC	ACT	GCC	GTC	TAT	TWC	TGT	GCG	CGT	CTG	GGT	(28)

Figura 5

Unión 4F11 a EGFL7 puede ser superada por el péptido p2

Los lisados celulares de 293 transfectadas con hEGfl7-His inmunoprecipitaron con 4F11 en presencia o ausencia de diferentes péptidos.

Péptido 1: RSPGLAPARPRYA (SEC ID N° : 29)

Péptido 2: RPRYACCPGWKRT (SEC ID N° : 5)

Péptido 3: GWKRTSGLPGACG (SEC ID N° : 30)

Péptido 4: péptido de control aleatorio

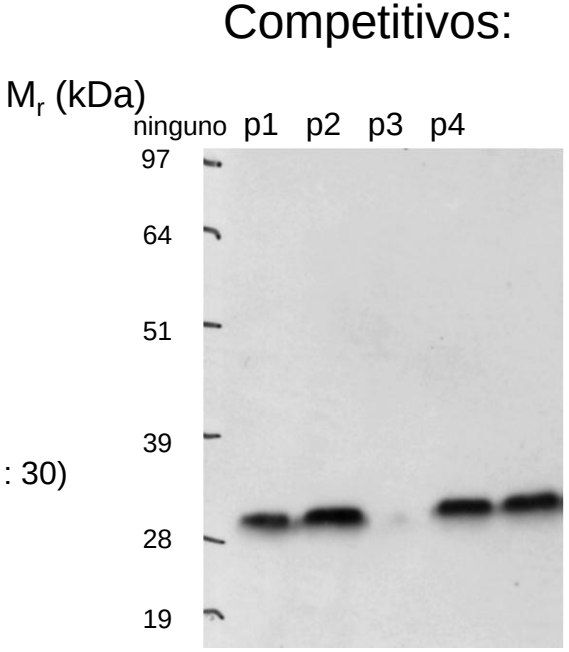


Figura 6

Unión de Fago 4F11-injerto a huEGFL7 truncado

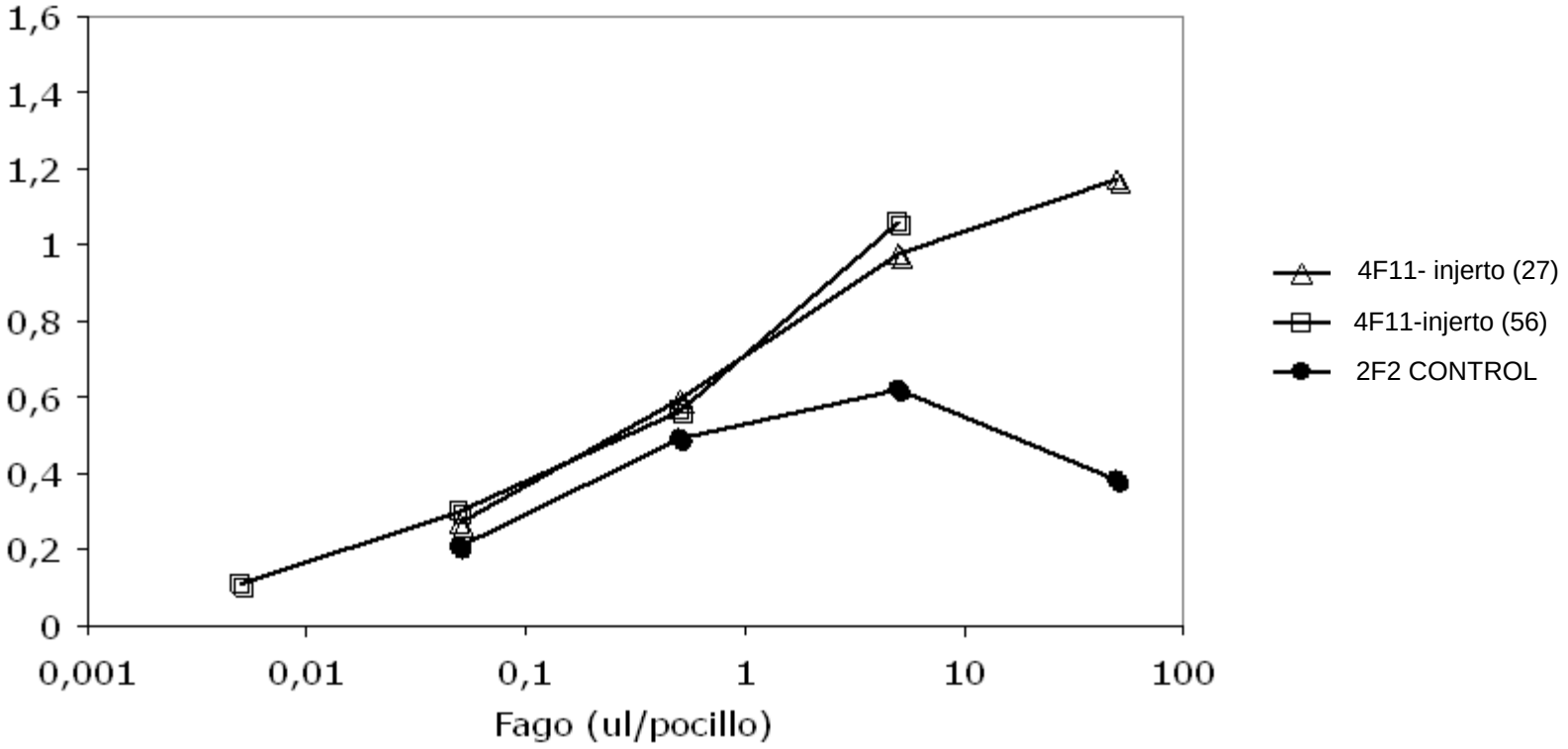


Figura 7

Unión de Fago 4F11 a Péptido p2 Biotinilado

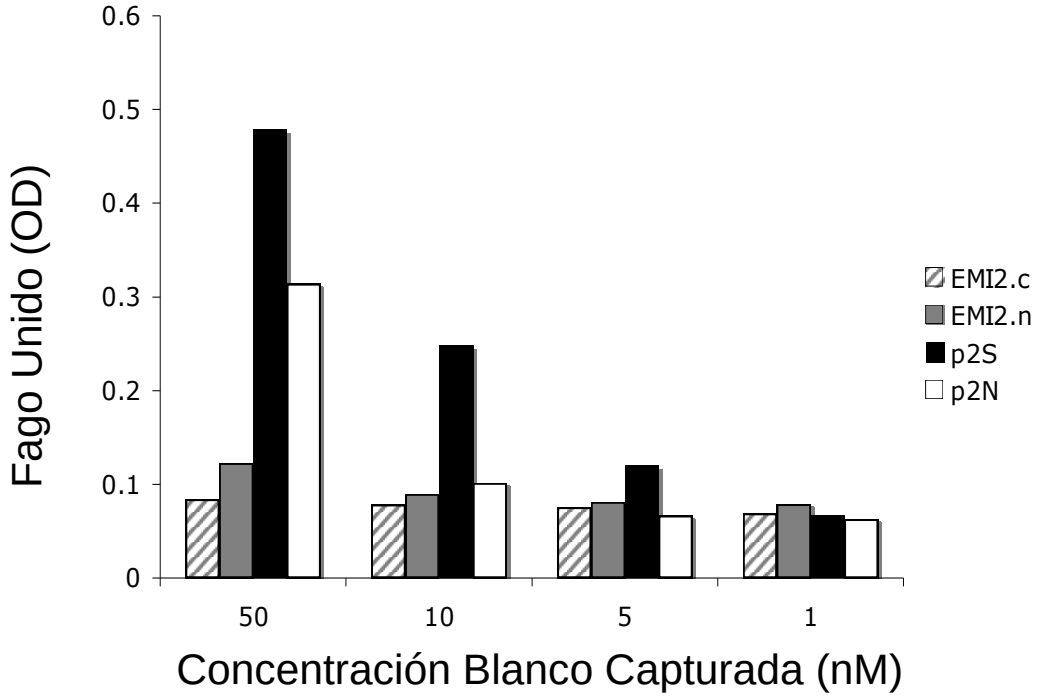


Figura 8

Resultados del Interruptor de Marco

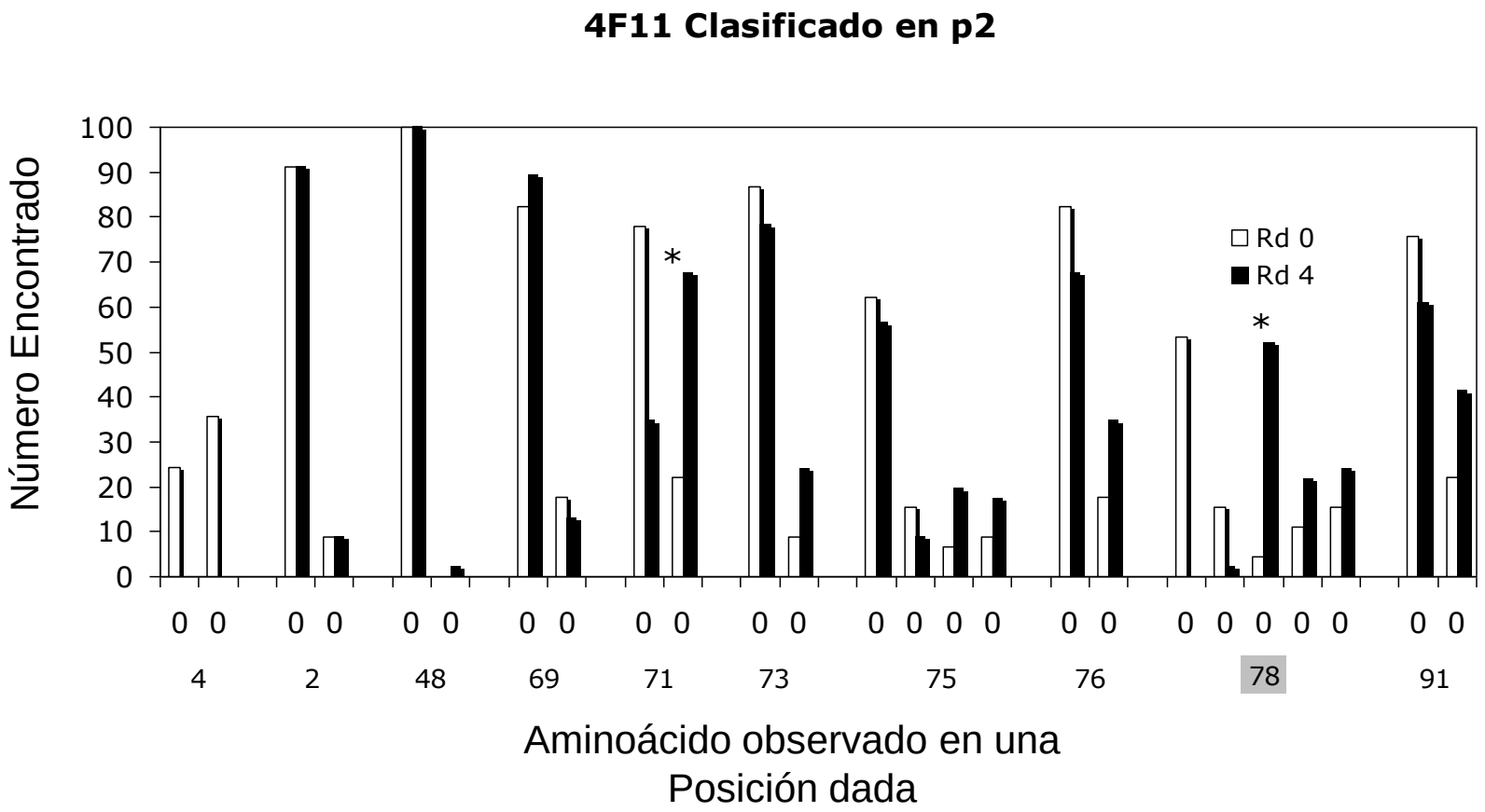


Figura 9

Resultados de Genoteca SP

CDR-L1		CDR-L2		CDR-L3		CDR-H1		CDR-H2		CDR-H3	
KASQSVDYDGDSYMS	(31)	**GASNLES**	(32)	**QQNNEDPYT**	(33)	**GHTFTTYGMS**	(34)	**GWINTHSGVPTYADDFKG**	(35)	**ARLGSSAVDY**	(36)
4F11.v1 framework											
KRSQSVDYDGDSYMS	(37)	GASYLES	(44)			GHTGTTYGMS	(49)	GWINWHSGVPTYADDFKG	(58)		
KASHSVDYDGDSYMS	(38)	GASNRES	(45)			GHTFTTYGYS	(50)	GWINWHSGVPTYADDFKG	(58)		
KASQSGDYDGDSYMS	(39)	GASNYES	(46)					GWINMHSGVPTYADDFKG	(59)		
		GASNRES	(45)					GWINTHSGVPTMADDFKG	(60)		
		GASNLEQ	(47)					GWINTHSGVPTMADDFKG	(60)		
								GWINTHSGVPTYAHDFKG	(61)		
								GWINTHSGVPTYADxFKG	(62)		
4F11.v2 framework											
KASQSVDYRGDSYMS	(40)	GASYLES	(44)	QQNNEDPFT	(48)	GHTFDTYGMS	(51)	GWINIHSGVPTYADDFKG	(63)	ANLGSSAVDY	(74)
KASQSVDYDGDSYVS	(41)	GASYLES		QQNNEDPFT		GHTFRTYGMS	(52)	GWINWHSGVPTYADDFKG	(64)		
KASQSVDYDGDSYVS		GASYLES				GVTFTTYGMS	(53)	GWINTRSGVPTYADDFKG	(65)		
KASQSVDYDGDSYVS		GASYLES				GHRFTTYGMS	(54)	GWINTHSGVPTIADDFKG	(66)		
KASQSVDYDGDSYVS		GASYLES				GHTFGTYGMS	(55)	GWINTHSGVPTYADDFSG	(67)		
		GASYLES						GWINTHSGVPTTADDFKG	(68)		
		GASYLES						GWINTHSGVPTYADTFKG	(69)		
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
		GASYLES									
4F11.v3 framework											
*KASQSVDYRGDSYMS	(40)	GASYLES	(44)			GHTRTTYGMS	(56)	GWINIHSGVPTYADDFKG	(70)	ARLGSCAVDY	(75)
KASQSVDYLGDSYMS	(42)	GASYLES				GHTSTTYGMS	(57)	GWINTHSGVPTYADMFKG	(71)	ARLGSCAVDY	(75)
KASQSVDYWGDSYMS	(43)	GASYLES				GHTRTTYGMS	(56)	GWINTHSGVPTYADDYKG	(72)	ARLGSYAVDY	(76)
		GASYLES				GHTRTTYGMS		GWINTHSGVPTYADDFKR	(73)	ARLGSYAVDY	(76)
		GASYLES				GHTRTTYGMS				ARLGSCAVDY	(75)
		GASYLES								ARLGSCAVDY	(75)
		GASYLES								ARLGSSAVDA	(77)
		GASYLES									
		GASYLES									

Figura 10

Diseño de Genoteca de Cadena Liviana

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
																								Kabat - CDR L1																				
																								Chothia - CDR L1																				
																																				Contacto - CDR L1								
huKI	**D**	**I**	**Q**	**M**	**T**	**Q**	**S**	**P**	**S**	**S**	**L**	**S**	**A**	**S**	**V**	**G**	**D**	**R**	**V**	**T**	**I**	**T**	**C**	**R**	**A**	**S**	**Q**							**S**	**I**	**S**	**N**	**Y**	**L**	**A**	**W**	**Y**	**Q**
mu4F11	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			D	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q
huF11 injerto	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			D	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q
Genoteca 1	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			S	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q
Genoteca 2	D	I	Q	**L**	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			**S**	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q

Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
													Kabat - CDR L2																															
													Chothia - CDR L2																															
								Contacto - CDR L2																																				
huKI	**Q**	**K**	**P**	**G**	**K**	**A**	**P**	**K**	**L**	**L**	**I**		**Y**	**A**	**A**	**S**	**S**	**L**	**E**	**S**	**G**	**V**	**P**	**S**	**R**	**F**	**S**	**G**	**S**	**G**	**S**	**G**	**T**	**D**	**F**	**T**	**L**	**T**	**I**	**S**	**S**	**L**	**Q**	**P**
mu4F11	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	N	L	E	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H	P	V	E	E
huF11 injerto	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Genoteca 1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Genoteca 2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
									Kabat - CDR L3																									
									Chothia - CDR L3																									
									Contacto - CDR L3																									
huKI	**E**	**D**	**F**	**A**	**T**	**Y**	**Y**	**C**	**Q**	**Q**	**Y**	**N**	**S**	**L**	**P**							**W**	**T**	**F**	**G**	**Q**	**G**	**T**	**K**	**V**	**E**	**I**	**K**	**R**
mu4F11	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	E	D	P							Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R
huF11 injerto	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	E	D	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
Genoteca 1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	E	E	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

Figura 11

Diseño de Genoteca de Cadena Pesada

Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41
hum III	**E**	**V**	**Q**	**L**	**V**	**E**	**S**	**G**	**G**	**G**	**L**	**V**	**Q**	**P**	**G**	**G**	**S**	**L**	**R**	**L**	**S**	**C**	**A**	**A**	**S**	**G**	**F**	**T**	**F**	**S**	**S**	**Y**	**A**	**M**	**S**			**W**	**V**	**R**	**Q**	**A**	**P**
mu4F11	Q	I	Q	L	V	Q	S	G	P	E	L	K	K	P	G	E	T	V	K	I	S	C	K	A	S	G	H	T	F	T	T	Y	G	M	S			W	V	K	Q	A	P
hu4F11injerto	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	H	T	F	T	T	Y	G	M	S			W	V	R	Q	A	P
Genoteca 1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	H	T	F	T	T	Y	G	M	S			W	V	R	Q	A	P
Genoteca 2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	H	T	F	T	T	Y	G	M	S			W	V	R	Q	A	P

Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2

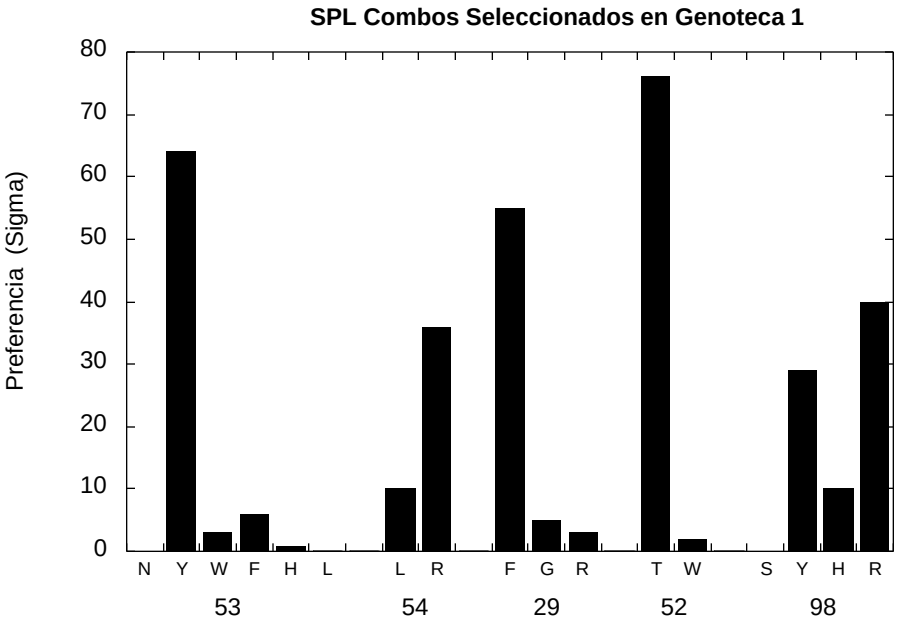
Kabat#	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
hum III	**G**	**K**	**G**	**L**	**E**	**W**	**V**	**S**	**V**	**I**	**S**	**G**			**D**	**G**	**G**	**S**	**T**	**Y**	**Y**	**A**	**D**	**S**	**V**	**K**	**G**	**R**	**F**	**T**	**I**	**S**	**R**	**D**	**N**	**S**	**K**	**N**	**T**	**L**	**Y**	**L**
mu4F11	G	K	G	L	K	W	M	G	W	I	N	T			H	S	G	V	P	T	Y	A	D	D	F	K	G	R	F	A	F	S	L	E	T	S	A	S	T	A	H	L
hu4F11injerto	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	N	T			H	S	G	V	P	T	Y	A	D	D	F	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
Genoteca 1	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	N	T			H	S	G	V	P	T	Y	A	D	D	F	K	G	R	F	T	I	S	**L**	D	N	S	K	N	T	**A**	Y	L
Genoteca 2	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	N	T			H	S	G	V	P	T	Y	A	D	D	F	K	G	R	F	T	I	S	**L**	D	N	S	K	**S**	T	**A**	Y	L

Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto- CDR H3

Kabat#	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	##	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
hum III	**Q**	**M**	**N**	**S**	**L**	**R**	**A**	**E**	**D**	**T**	**A**	**V**	**Y**	**Y**	**C**	**A**	**R**	**G**															**F**	**D**	**Y**	**W**	**G**	**Q**	**G**	**T**	**L**	**V**	**T**	**V**	**S**	**S**
mu4F11	Q	I	N	N	L	K	N	E	D	T	A	T	Y	F	C	A	R	L	G	S	S	A											V	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
hu4F11injerto	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	G	S	S	A											V	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
Genoteca 1	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	G	S	S	A											V	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
Genoteca 2	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	**F**	C	A	R	L	G	S	S	A											V	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

Figura 12

Clasificación de Resultados de Genotecas Limitadas 1 y 2



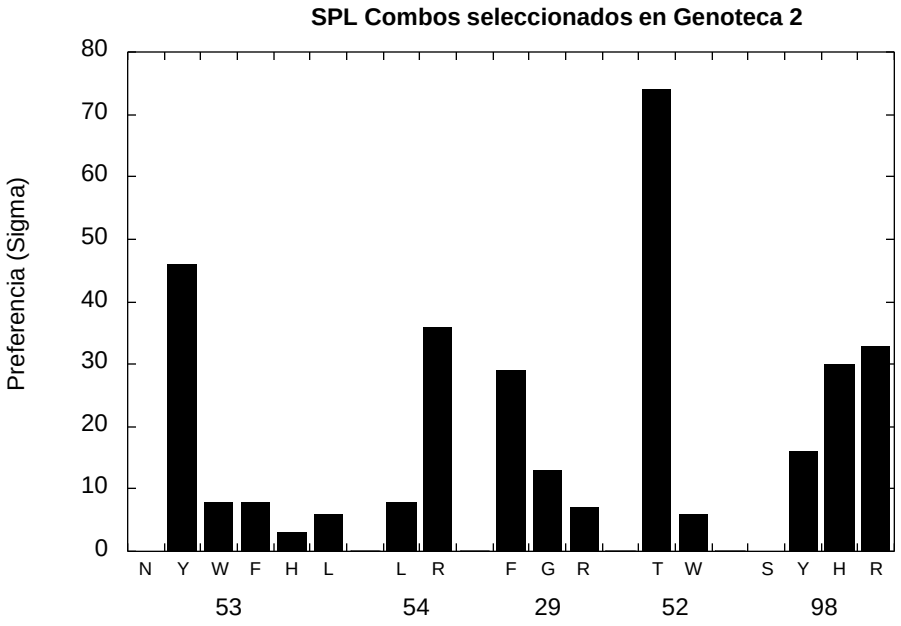
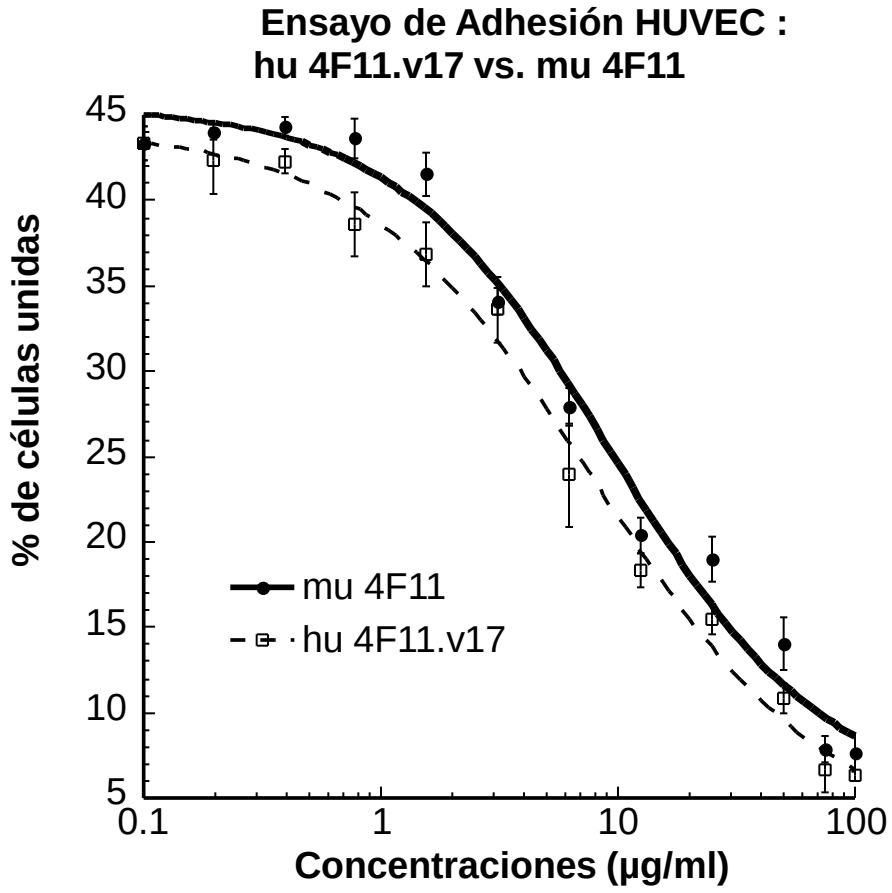


Figura 13

Unión de variantes de 4F11 a EGFL7 humano



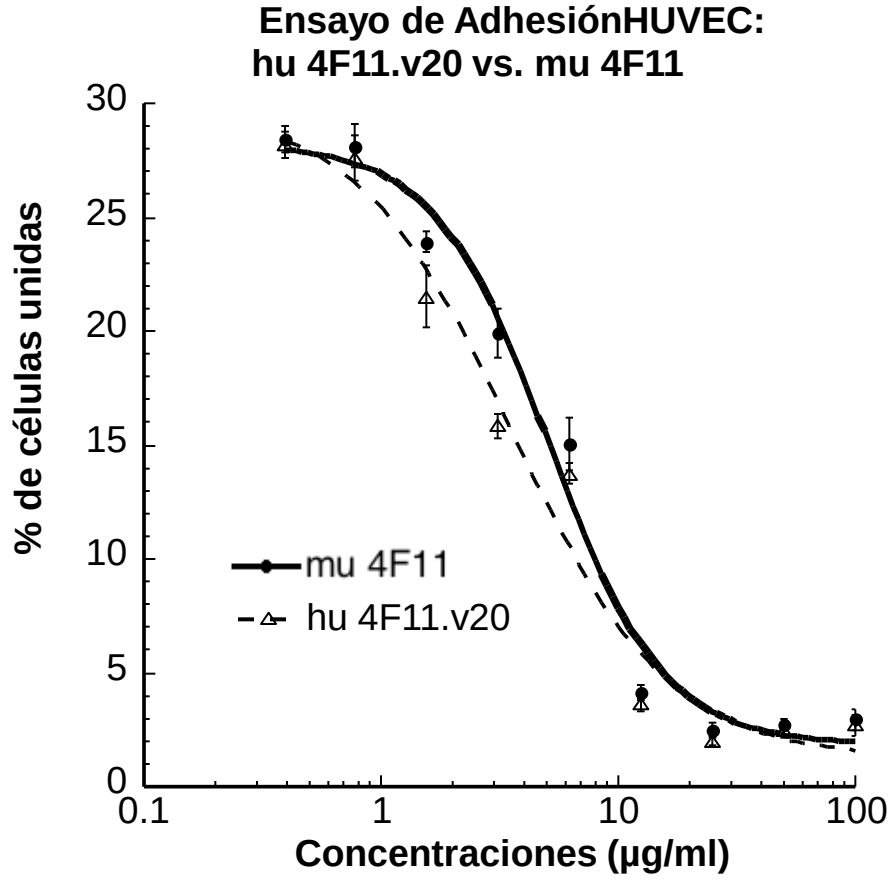


Figura 14

Unión de variantes de 4F11 a EGFL7 de ratón

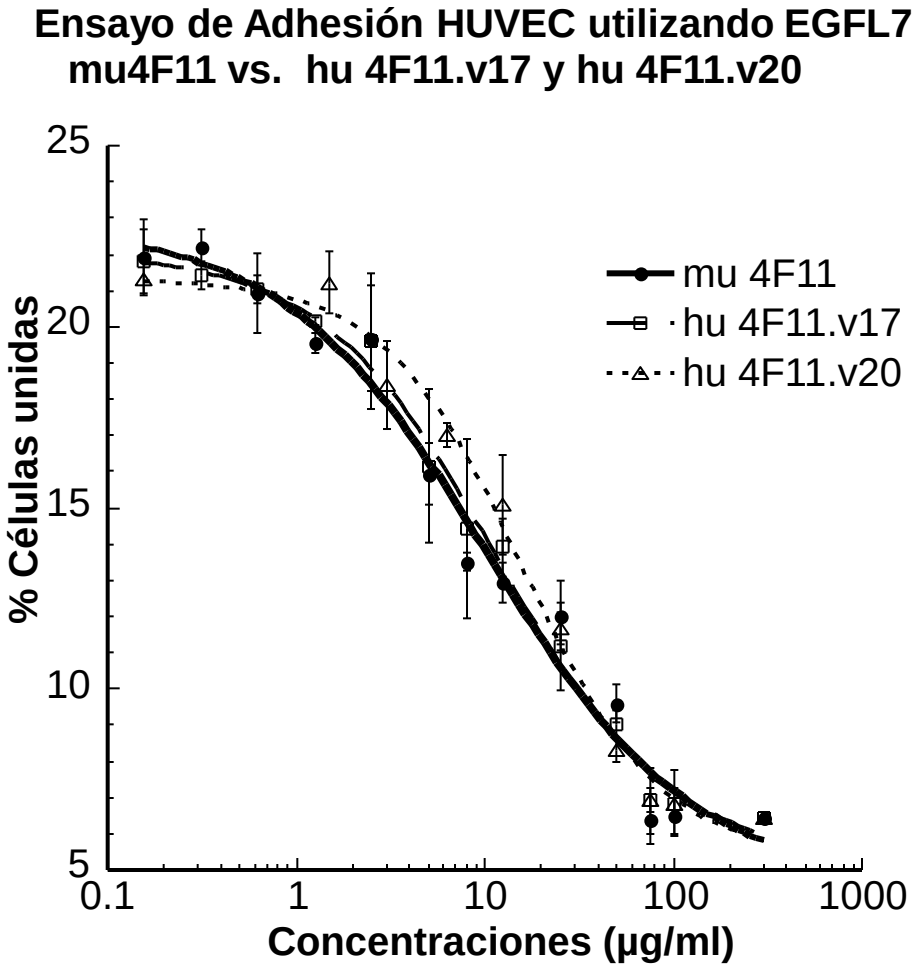


Figura 15

Cadena Liviana Variable de 4F11 Humanizado

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
																								Kabat - CDR L1																				
																								Chothia - CDR L1																				
																																			Contacto - CDR L1								
huKI	**D**	**I**	**Q**	**M**	**T**	**Q**	**S**	**P**	**S**	**S**	**L**	**S**	**A**	**S**	**V**	**G**	**D**	**R**	**V**	**T**	**I**	**T**	**C**	**R**	**A**	**S**	**Q**							**S**	**I**	**S**	**N**	**Y**	**L**	**A**	**W**	**Y**	**Q**
mu4F11	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			D	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q
hu4F11 injerto	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			D	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q
4F11.v17	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			**S**	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q
4F11.v22	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y			**S**	G	D	S	Y	M	S	W	Y	Q

Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
													Kabat - CDR L2																															
													Chothia - CDR L2																															
									Contacto - CDR L2																																			
huKI	**Q**	**K**	**P**	**G**	**K**	**A**	**P**	**K**	**L**	**L**	**I**		**Y**	**A**	**A**	**S**	**S**	**L**	**E**	**S**	**G**	**V**	**P**	**S**	**R**	**F**	**S**	**G**	**S**	**G**	**S**	**G**	**T**	**D**	**F**	**T**	**L**	**T**	**I**	**S**	**S**	**L**	**Q**	**P**
mu4F11	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	N	L	E	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H	P	V	E	E
hu4F11 injerto	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
4F11.v17	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	**Y**	**R**	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
4F11.v22	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	G	A	S	**Y**	**R**	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
									Kabat - CDR L3																									
									Chothia - CDR L3																									
									Contacto - CDR L3																									
huKI	**E**	**D**	**F**	**A**	**T**	**Y**	**Y**	**C**	**Q**	**Q**	**Y**	**N**	**S**	**L**	**P**							**W**	**T**	**F**	**G**	**Q**	**G**	**T**	**K**	**V**	**E**	**I**	**K**	**R**
mu4F11	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	E	D	P							Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R
hu4F11 injerto	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	E	D	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
4F11.v17	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	E	**E**	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
4F11.v22	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	N	N	E	**E**	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

Figura 16

Cadena Pesada Variable de 4F11 Humanizado

Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41
hum III	**E**	**V**	**Q**	**L**	**V**	**E**	**S**	**G**	**G**	**G**	**L**	**V**	**Q**	**P**	**G**	**G**	**S**	**L**	**R**	**L**	**S**	**C**	**A**	**A**	**S**	**G**	**F**	**T**	**F**	**S**	**S**	**Y**	**A**	**M**	**S**			**W**	**V**	**R**	**Q**	**A**	**P**
mu4F11	Q	I	Q	L	V	Q	S	G	P	E	L	K	K	P	G	E	T	V	K	I	S	C	K	A	S	G	H	T	F	T	T	Y	G	M	S			W	V	K	Q	A	P
hu4F11graft	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	H	T	F	T	T	Y	G	M	S			W	V	R	Q	A	P
4F11.v17	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	H	T	**F**	T	T	Y	G	M	S			W	V	R	Q	A	P
4F11.v22	E	**I**	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	H	T	**F**	T	T	Y	G	M	S			W	V	R	Q	A	P

Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2

Kabat#	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
hum III	**G**	**K**	**G**	**L**	**E**	**W**	**V**	**S**	**V**	**I**	**S**	**G**			**D**	**G**	**G**	**S**	**T**	**Y**	**Y**	**A**	**D**	**S**	**V**	**K**	**G**	**R**	**F**	**T**	**I**	**S**	**R**	**D**	**N**	**S**	**K**	**N**	**T**	**L**	**Y**	**L**
mu4F11	G	K	G	L	K	W	M	G	W	I	N	T			H	S	G	V	P	T	Y	A	D	D	F	K	G	R	F	A	F	S	L	E	T	S	A	S	T	A	H	L
hu4F11graft	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	N	T			H	S	G	V	P	T	Y	A	D	D	F	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
4F11.v17	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	N	**T**			H	S	G	V	P	T	Y	A	D	D	F	K	G	R	F	T	I	S	**L**	D	N	S	K	N	T	**A**	Y	L
4F11.v22	G	K	G	L	E	W	**M**	G	W	I	N	**T**			H	S	G	V	P	T	Y	A	D	D	F	K	G	R	F	T	I	S	**L**	D	N	S	K	**S**	T	**A**	Y	L

Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3

Kabat#	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	##	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
hum III	**Q**	**M**	**N**	**S**	**L**	**R**	**A**	**E**	**D**	**T**	**A**	**V**	**Y**	**Y**	**C**	**A**	**R**	**G**																**F**	**D**	**Y**	**W**	**G**	**Q**	**G**	**T**	**L**	**V**	**T**	**V**	**S**	**S**
mu4F11	Q	I	N	N	L	K	N	E	D	T	A	T	Y	F	C	A	R	L	G	S	S	A												V	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
hu4F11graft	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	G	S	S	A												V	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
4F11.v17	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	G	S	**Y**	A												V	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
4F11.v22	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	**F**	C	A	R	L	G	S	**Y**	A												V	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

Figura 17

Dominio Liviano Variable 18F7

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
																								Kabat - CDR L1																				
																								Chothia - CDR L1																				
																																				Contacto - CDR L1								
huKI	**D**	**I**	**Q**	**M**	**T**	**Q**	**S**	**P**	**S**	**S**	**L**	**S**	**A**	**S**	**V**	**G**	**D**	**R**	**V**	**T**	**I**	**T**	**C**	**R**	**A**	**S**	**Q**							**S**	**I**	**S**	**N**	**Y**	**L**	**A**	**W**	**Y**	**Q**
mu18F7	D	I	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	T	S	Q	S	L	V	H	I		N	G	I	T	Y	L	H	W	Y	L
18F7-injerto	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	T	S	Q	S	L	V	H	I		N	G	I	T	Y	L	H	W	Y	Q
		*		*																																					*	*	

Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
													Kabat - CDR L2																															
													Chothia - CDR L2																															
									Contacto - CDR L2																																			
huKI	**Q**	**K**	**P**	**G**	**K**	**A**	**P**	**K**	**L**	**L**	**I**		**Y**	**A**	**A**	**S**	**S**	**L**	**E**	**S**	**G**	**V**	**P**	**S**	**R**	**F**	**S**	**G**	**S**	**G**	**S**	**G**	**T**	**D**	**F**	**T**	**L**	**T**	**I**	**S**	**S**	**L**	**Q**	**P**
mu18F7	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I		Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A
18F7-injerto	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	*						*		*	*	*		*															*		*		*	*		*									

Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
									Kabat - CDR L3																									
									Chothia - CDR L3																									
									Contacto - CDR L3																									
huKI	**E**	**D**	**F**	**A**	**T**	**Y**	**Y**	**C**	**Q**	**Q**	**Y**	**N**	**S**	**L**	**P**							**W**	**T**	**F**	**G**	**Q**	**G**	**T**	**K**	**V**	**E**	**I**	**K**	**R**
mu18F7	E	D	L	G	V	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P							L	T	F	G	A	G	T	K	V	E	I	K	R
18F7-injerto	E	D	F	A	T	Y	Y	C	S	Q	S	T	H	V	P							L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

Figura 18

Dominio Pesado Variable18F7

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41
																															Kabat - CDR H1												
																										Chothia - CDR H1																	
																														Contacto - CDR H1													
hum III	**E**	**V**	**Q**	**L**	**V**	**E**	**S**	**G**	**G**	**G**	**L**	**V**	**Q**	**P**	**G**	**G**	**S**	**L**	**R**	**L**	**S**	**C**	**A**	**A**	**S**	**G**	**F**	**T**	**F**	**S**	**S**	**Y**	**A**	**M**	**S**			**W**	**V**	**R**	**Q**	**A**	**P**
mu18F7	E	V	Q	L	H	Q	S	G	P	D	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	D	Y	Y	M	N			W	V	K	Q	S	H
18F7-injerto	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	I	D	Y	Y	M	N			W	V	R	Q	A	P
		*																						*															*		*		

Kabat#	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
									Kabat - CDR H2																																	
												Chothia - CDR H2																															
						Contacto - CDR H2																																					
hum III	**G**	**K**	**G**	**L**	**E**	**W**	**V**	**S**	**V**	**I**	**S**	**G**			**D**	**G**	**G**	**S**	**T**	**Y**	**Y**	**A**	**D**	**S**	**V**	**K**	**G**	**R**	**F**	**T**	**I**	**S**	**R**	**D**	**N**	**S**	**K**	**N**	**T**	**L**	**Y**	**L**
mu18F7	G	K	S	L	E	W	I	G	D	I	N	L			D	N	G	G	T	H	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M
18F7injerto	G	K	G	L	E	W	V	G	D	I	N	L			D	N	G	G	T	H	Y	N	Q	K	F	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
				*		*	*	*																					*		*		*		*		*	*		*		*

Kabat#	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	##	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
																		Kabat - CDR H3																										
																		Chothia - CDR H3																										
																Contacto - CDR H3																													
hum III	**Q**	**M**	**N**	**S**	**L**	**R**	**A**	**E**	**D**	**T**	**A**	**V**	**Y**	**Y**	**C**	**A**	**R**	**G**															**F**	**D**	**Y**	**W**	**G**	**Q**	**G**	**T**	**L**	**V**	**T**	**V**	**S**	**S**
mu18F7	E	L	H	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	E	G	V	Y	H	D	Y	D	D	Y	A					M	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	A
18F7-injerto	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	G	V	Y	H	D	Y	D	D	Y	A					M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
														*		*	*																			*									

Figura 19

Diseño de Oligonucleótido para la Genoteca de interruptor de Marco

VL- marco región 3

				86		87			90				
E	D	F	A	T	Y	**Y**	C	**S**	Q	**S**	T	H	
E	D	L	G	V	Y	**F**	C	**S**	Q	**S**	T	H	(88)
GAA	GAC	TTC	GCA	ACT	TAT	TAC	TGT	AGC	CAG	AGC	ACC	CAC	(89)
													(90)
GAA	GAC	TTC	GCA	ACT	TAT	TWC	TGT	AGC	CAG	AGC	ACC	CAC	(91)

VH- marco región 2

			45			48		50		52	52		
G	K	G	**L**	E	**W**	V	G	D	I	N	L	D	
G	K	S	**L**	E	**W**	I	G	D	I	N	L	D	(92)
GGT	AAG	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	GGT	GAT	ATC	AAC	CTG	GAT	(93)
													(94)
GGT	AAG	GGC	CTG	GAA	TGG	RTC	GGT	GAT	ATC	AAC	CTG	GAT	(95)

VH- marco región 3

61				65		67		69	70	71		73		75	76		78		80		82	82	82	82		
Q	K	F	K	G	R	F	T	I	S	R	D	T	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	
Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	H	S	L	T	(96)
CAG	AAA	TTC	AAA	GGT	CGT	TTC	ACT	ATA	AGC	CGC	GAC	ACC	TCC	AAA	AAC	ACA	CTG	TAC	CTA	CAA	ATG	AAC	AGC	TTA	AGA	(97)
																										(98)
CAG	AAA	TTC	AAA	GGT	CGT	KYC	ACT	MTC	AGC	SKT	GAC	AMG	TCC	ARS	ARC	ACA	SYG	TAC	MTG	CAA	ATG	AAC	AGC	TTA	AGA	(99)
						+SV				+LG				+NR			+PV									

Figura 20

Unión de 18F7 a EGFL7 puede ser superada por los péptidos EMI1 o p5

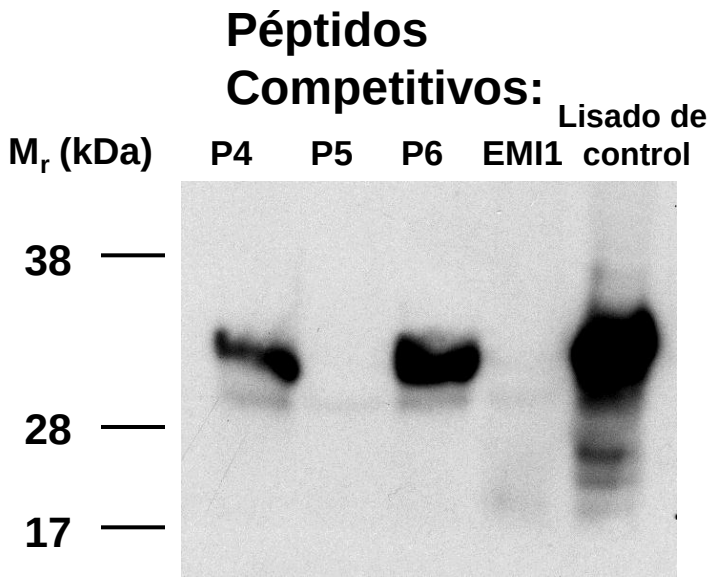


Figura 21

Unión de Fago18F7-injerto a huEGFL7 truncado

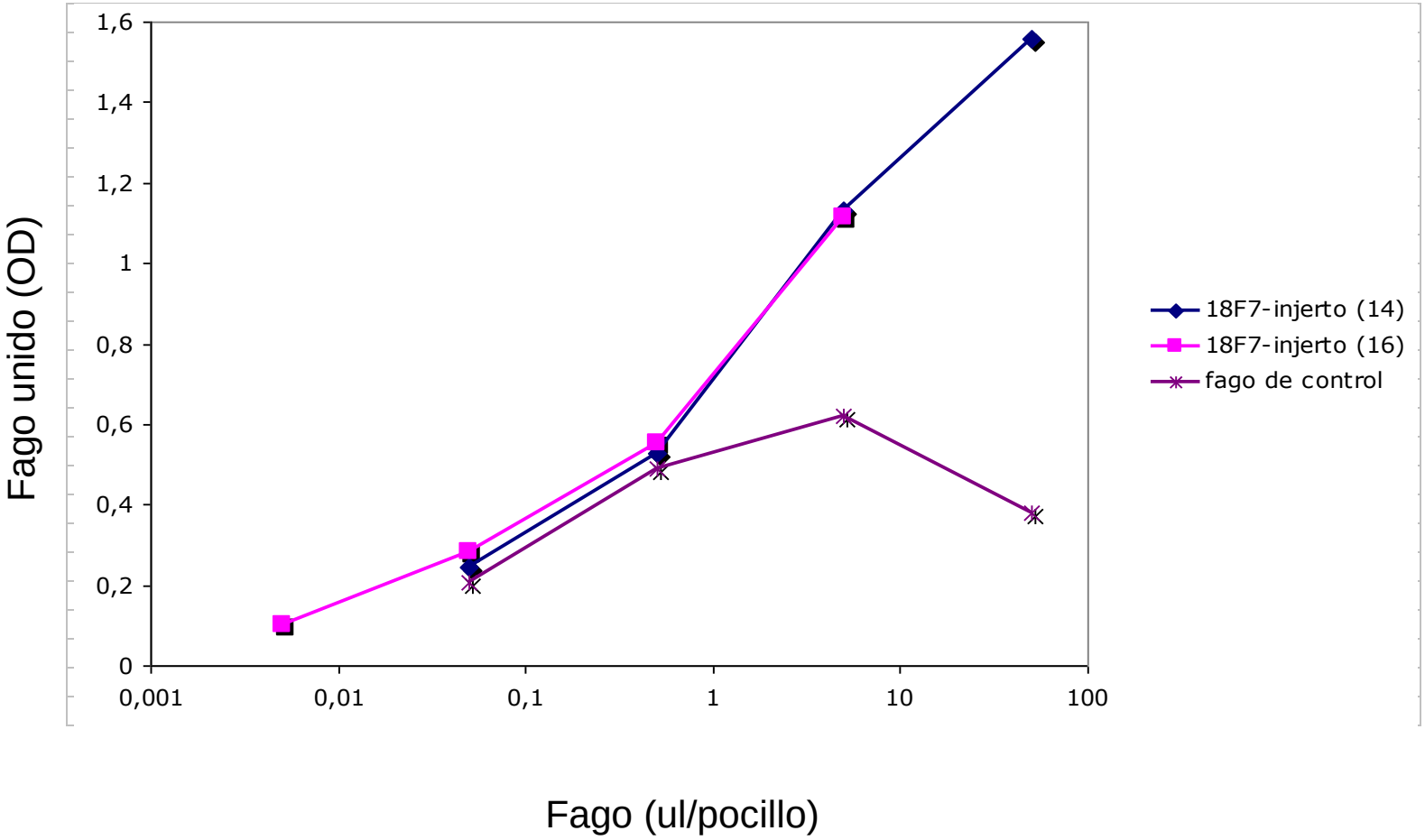


Figura 22

Unión de Fago18F7 a Péptido p5 Biotinilado

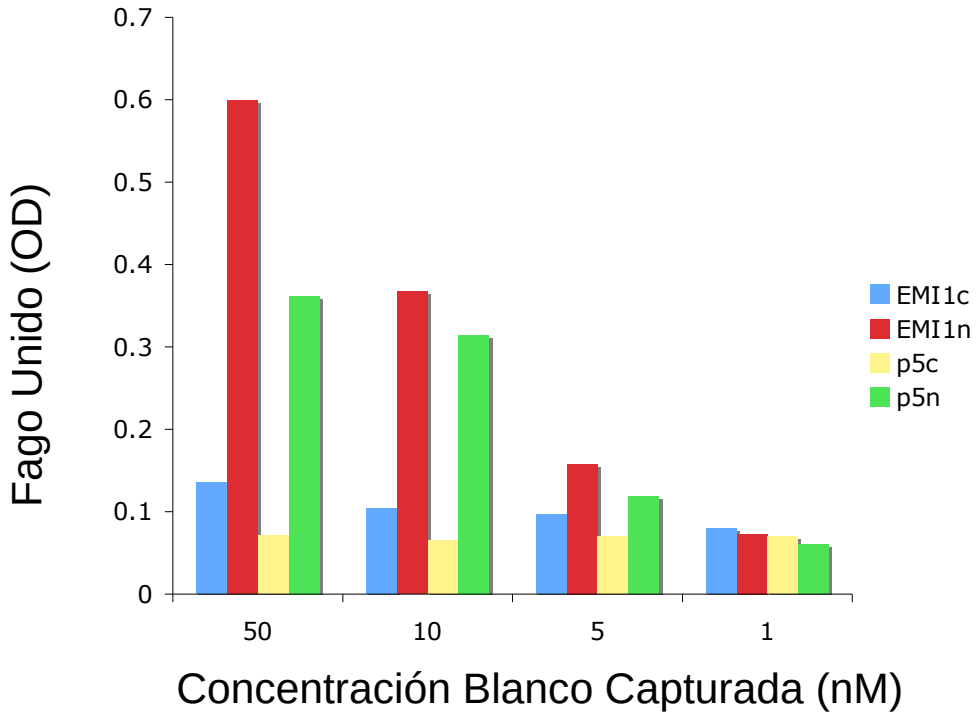


Figura 23

Resultados de Interruptor de Marco

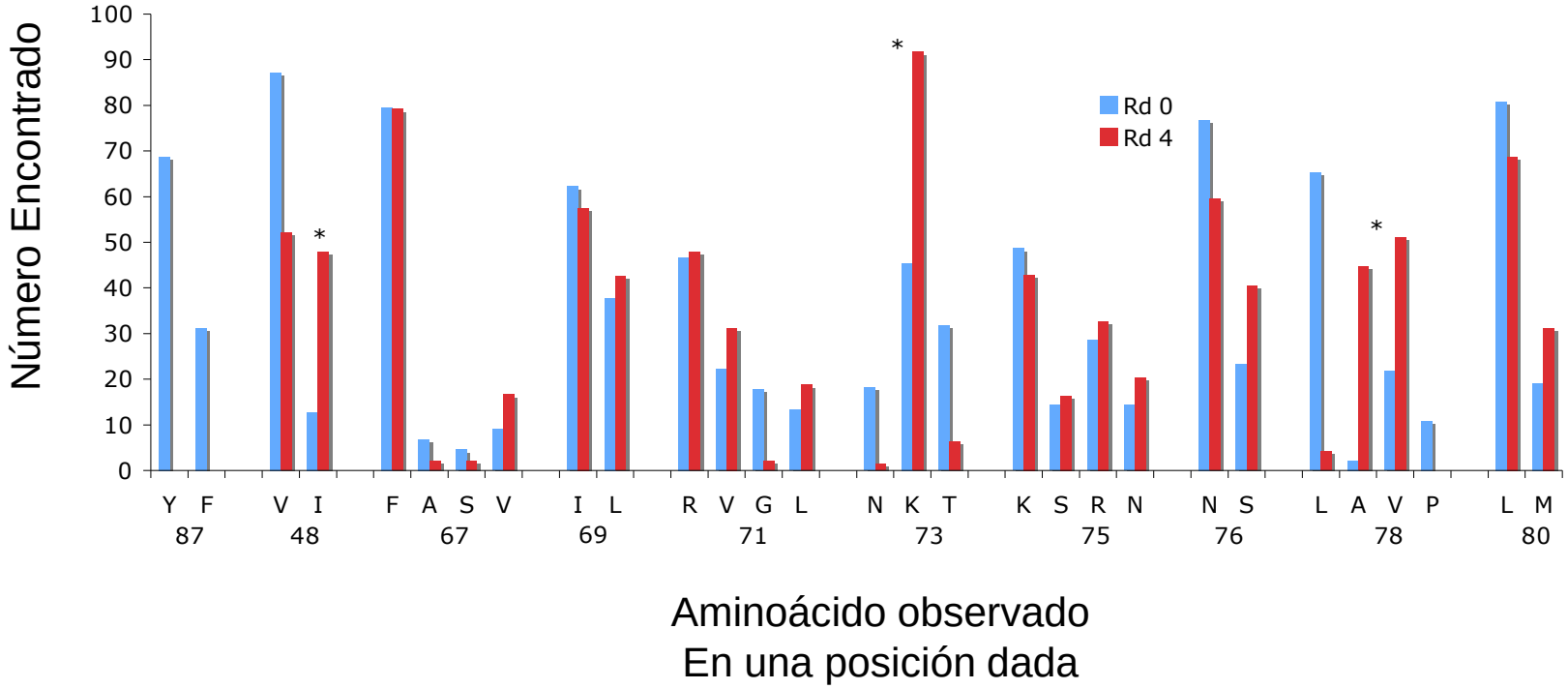


Figura 24

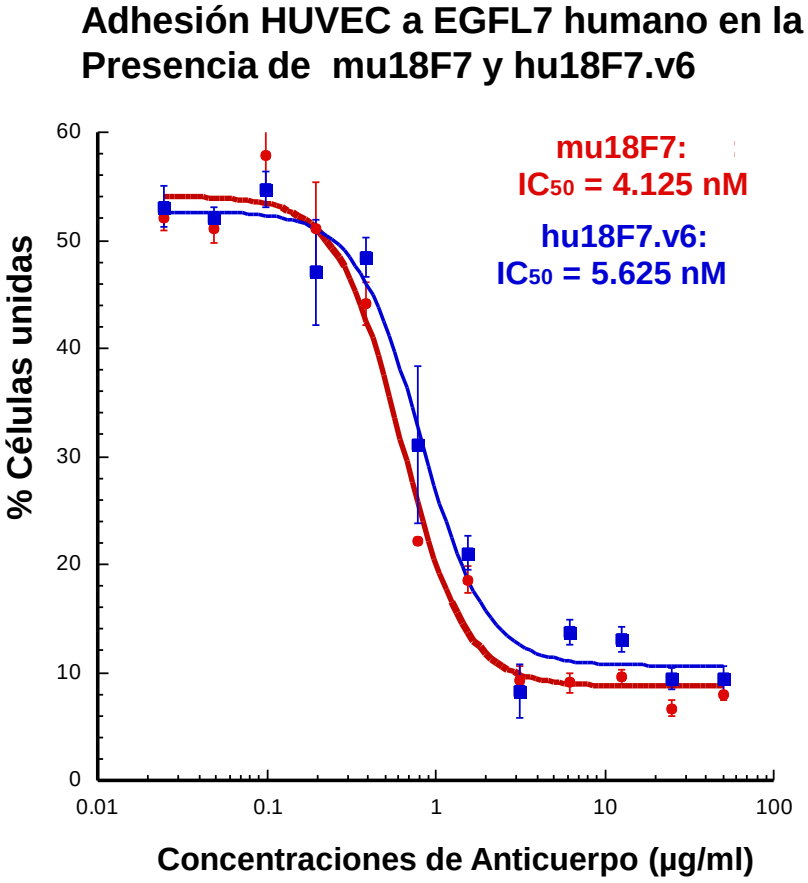
Resultados de Genoteca SP

CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
RTSQSLVHINGITYLH (100)	RVSNRFS (101)	SQSTHVPLT (102)	GYTFIDYYMN (103)	GDINLDNGGTHYNQKFKG (104)	AREGVYHDYDDYAMDY (105)
18F7-graft (N73, L78)					
QTSQSLVHINGITYLH (106)	RVSNDFS (125)	*AQSTHVPLT (130)	GYTVIDYYMN (146)	GDINLDGGGTHYNQKFKG (154)	NREGVYHDYDDYAMDY (155)
RTSQSLVHYNGITYLH (107)		*GQSTHVPLT (131)	GYTFIDYYIN (147)	GDINLDNGKTHYNQKFKG (156)	(188)
RTSQSLVPINGITYLH (108)		*LQSTHVPLT (132)		GDINLLNGGTHYNQKFKG (157)	
		SQSCHVPLT (133)		GDINLDNGRTHYNQKFKG (158)	
		SQSTFVPLT (134)		GDINLDNGITHYNQKFKG (159)	
				GDINLDNGGGHYNQKFKG (160)	
				GDINLDNGGTHYSQKFKG (161)	
				GDINLDNGGTHYNNKFKG (162)	
				GDINLDNGGTHYNQKQKG (163)	
				GDINLDNGGTHYNQKFTG (164)	
				GDINLDNGGTHYNQKFKH (165)	
				GDINLDNGGTHYNQKFKS	
18F7-K (K73, L78)					
STSQSLVHINGITYLH (109)		*AQSTHVPLT (135)			
RTSQSLVHLNGITYLH (110)		*GQSTHVPLT (136)			
		*LQSTHVPLT (137)			
18F7-KV (K73, V78)					
(111)					
LTSQSLVHINGITYLH (112)	RVSNRIS (126)	*AQSTHVPLT (138)		GDINADNGGTHYNQKFKG (166)	TREGVYHDYDDYAMDY (167)
RWSQSLVHINGITYLH (113)	RVSNRTS (127)	NQSTHVPLT (139)		GDINLDNGTTHYNQKFKG	AREGVYHPYDDYAMDY
RPSQSLVHINGITYLH (114)				GDINLDNGGTHYNAKFKG (168)	
RTHQSLVHINGITYLH (115)				GDINLDNGGTHYNNKFKG (169)	(189)
RTSQSVVHINGITYLH (116)				GDINLDNGGTHYNQVFKG (170)	(190)
RTSQSLVHTNGITYLH (117)				GDINLDNGGTHYNQKFKR (171)	
RTSQSLVHLNGITYLH (118)				GDINLDRGGTHYNQKFKG (172)	
RTSQSLVHPNGITYLH (119)					
RTSQSLVHINGITYLG					
18F7-KA (K73, A78)					
TTSQSLVHINGITYLH (120)	RVSNRGS (128)	*AQSTHVPLT (140)	GYNFIDYYMN (148)	(173)	
LTSQSLVHINGITYLH (121)	RVSNRAS (129)	IQSTHVPLT (141)	GYTFMDYYMN (149)	GDINNDNGGTHYNQKFKG (174)	AREGVYHPYDDYAMDY (175)
RTSDSLVHINGITYLH (122)		*LQSTHVPLT (142)	GYTFRDYYMN (150)	GDINPDNGGTHYNQKFKG (175)	AREGVYHDYDDYAWDY (176)
RTSQGLVHINGITYLH (123)		*VQSTHVPLT (143)	GYTFSDYYMN (151)	GDINLRNGGTHYNQKFKG (176)	
RTSQSLVHYNGITYLH (124)		TQSTHVPLT (144)	GYTFIDQYMN (152)	GDINLDYGGTHYNQKFKG (177)	(191)
		KQSTHVPLT (145)	GYTFIDKYMN (153)	GDINLDSGGTHYNQKFKG (178)	(192)
				GDINLDRGGTHYNQKFKG (179)	
				GDINLDKGGTHYNQKFKG (180)	
				GDINLDNGVTHYNQKFKG (181)	
				GDINLDNGSTHYNQKFKG (182)	
				GDINLDNGGRHYNQKFKG (183)	
				GDINLDNGGTHVNQKFKG (184)	
				GDINLDNGGTHINQKFKG (185)	
				GDINLDNGGTHLNQKFKG (186)	
				GDINLDNGGTHYNQKFKR (187)	
				GDINLDNGGTHYNQKFKS	

Clones altamente abundantes

Figura 25

Inhibición de Adhesión HUVEC a EGFL7



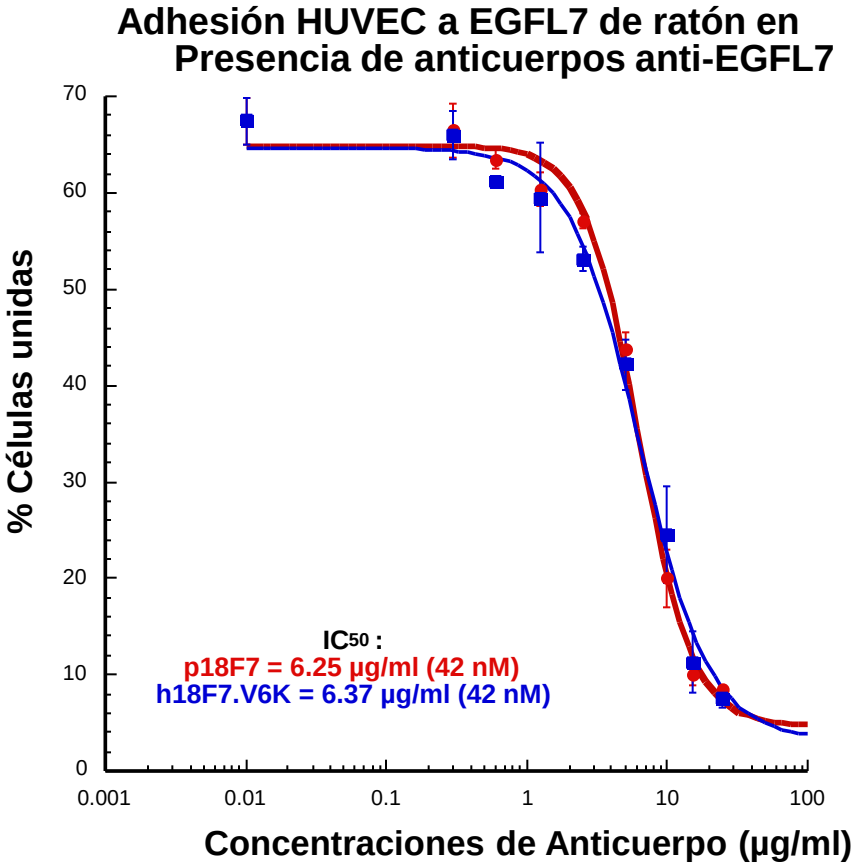
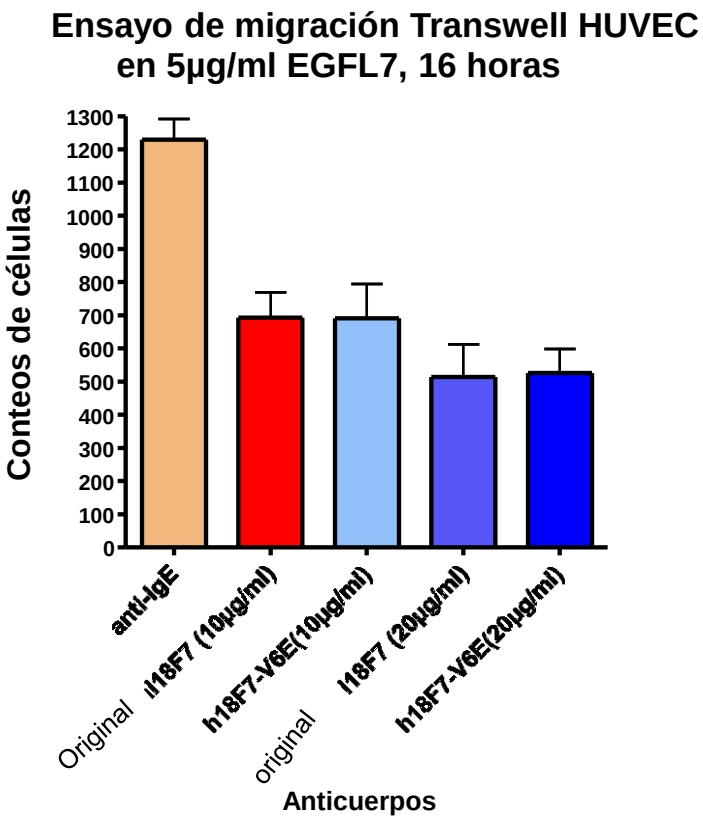


Figura 26

Inhibición de Migración Transwell HUVEC



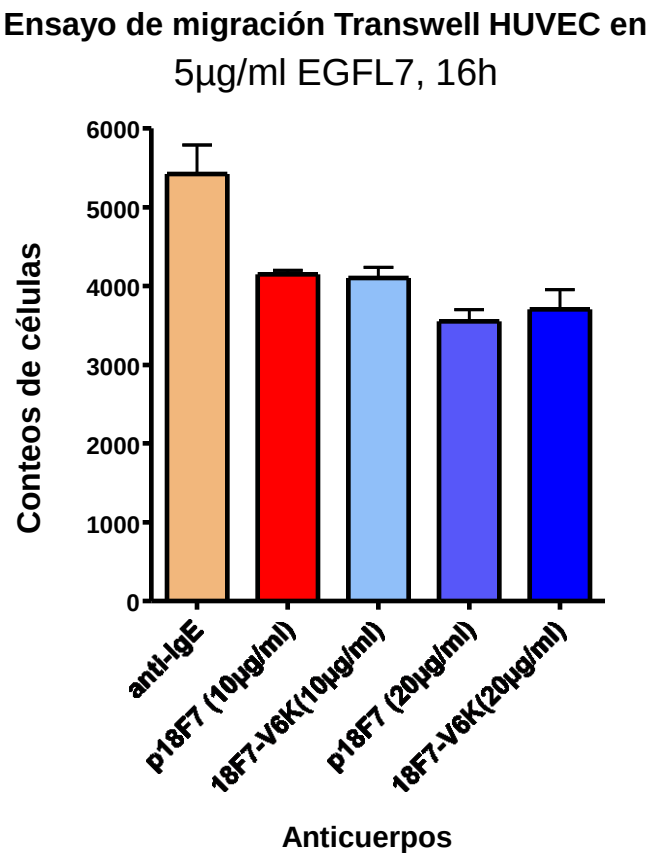


Figura 27

V_L hu 18F7.v6k

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1

huKI	**D**	**I**	**Q**	**M**	**T**	**Q**	**S**	**P**	**S**	**S**	**L**	**S**	**A**	**S**	**V**	**G**	**D**	**R**	**V**	**T**	**I**	**T**	**C**	**R**	**A**	**S**	**Q**						**S**	**I**	**S**	**N**	**Y**	**L**	**A**	**W**	**Y**	**Q**
mu18F7	D	I	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	T	S	Q	S	L	V	H	I		N	G	I	T	Y	L	H	W	Y	L
18F7.v6	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	T	S	Q	S	L	V	H	I		N	G	I	T	Y	L	H	W	Y	Q
18F7.v6k	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	T	S	Q	S	L	V	H	I		N	A	I	T	Y	L	H	W	Y	Q
		*		*																																					*	*		

Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 A 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2

huKI	**Q**	**K**	**P**	**G**	**K**	**A**	**P**	**K**	**L**	**L**	**I**		**Y**	**A**	**A**	**S**	**S**	**L**	**E**	**S**	**G**	**V**	**P**	**S**	**R**	**F**	**S**	**G**	**S**	**G**	**S**	**G**	**T**	**D**	**F**	**T**	**L**	**T**	**I**	**S**	**S**	**L**	**Q**	**P**
mu18F7	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I		Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A
18F7.v6	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	*						*		*	*	*		*															*		*		*	*		*										

Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3

huKI	**E**	**D**	**F**	**A**	**T**	**Y**	**Y**	**C**	**Q**	**Q**	**Y**	**N**	**S**	**L**	**P**						**W**	**T**	**F**	**G**	**Q**	**G**	**T**	**K**	**V**	**E**	**I**	**K**	**R**
mu18F7	E	D	L	G	V	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P						L	T	F	G	A	G	T	K	V	E	I	K	R
18F7.v6	E	D	F	A	T	Y	Y	C	G	Q	S	T	H	V	P						L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

Figura 28

V_H hu 18F7.v6k

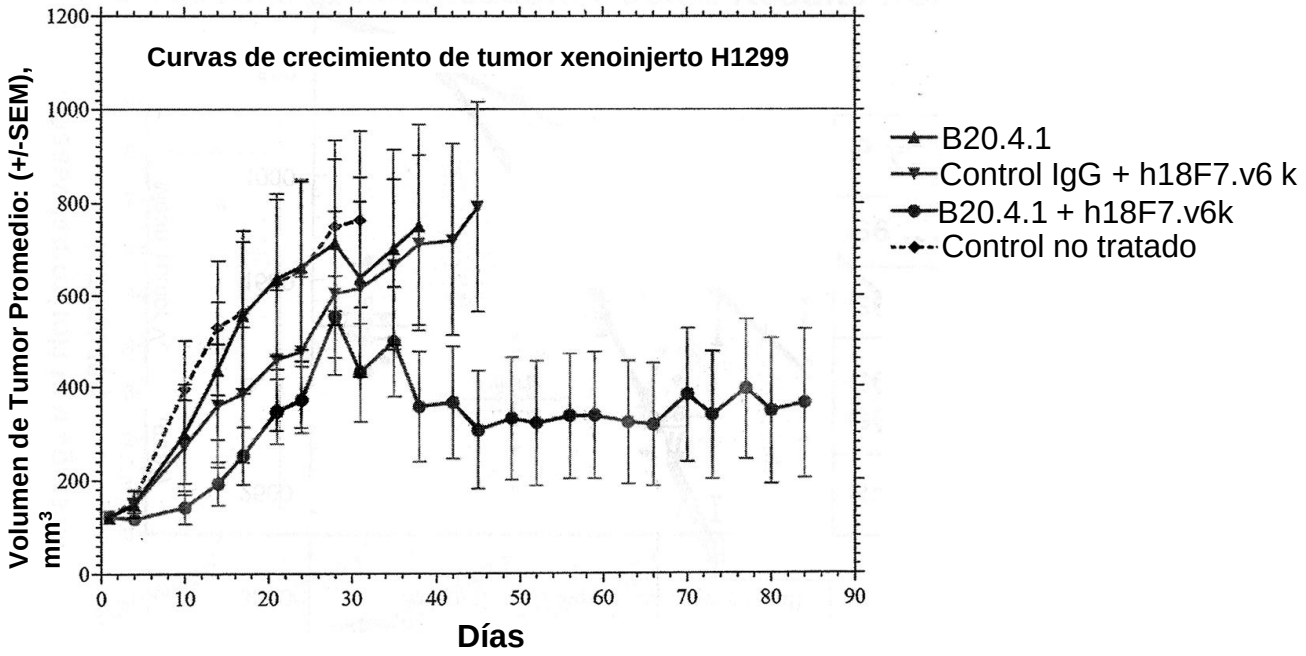
Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41
																															Kabat - CDR H1												
																										Chothia - CDR H1																
																															Contacto - CDR H1												
hum III	**E**	**V**	**Q**	**L**	**V**	**E**	**S**	**G**	**G**	**G**	**L**	**V**	**Q**	**P**	**G**	**G**	**S**	**L**	**R**	**L**	**S**	**C**	**A**	**A**	**S**	**G**	**F**	**T**	**F**	**S**	**S**	**Y**	**A**	**M**	**S**			**W**	**V**	**R**	**Q**	**A**	**P**
mu18F7	E	V	Q	L	H	Q	S	G	P	D	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	D	Y	Y	M	N			W	V	K	Q	S	H
Hu 18F7.v6	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	I	D	Y	Y	M	N			W	V	R	Q	A	P
		*																						*															*		*		

Kabat#	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
									Kabat - CDR H2																																	
											Chothia - CDR H2																															
						Contacto - CDR H2																																					
hum III	**G**	**K**	**G**	**L**	**E**	**W**	**V**	**S**	**V**	**I**	**S**	**G**			**D**	**G**	**G**	**S**	**T**	**Y**	**Y**	**A**	**D**	**S**	**V**	**K**	**G**	**R**	**F**	**T**	**I**	**S**	**R**	**D**	**N**	**S**	**K**	**N**	**T**	**L**	**Y**	**L**
mu18F7	G	K	S	L	E	W	I	G	D	I	N	L			D	N	G	G	T	H	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M
Hu 18F7.v6	G	K	G	L	E	W	V	G	D	I	N	L			D	N	G	G	T	H	Y	N	Q	K	F	K	G	R	F	T	I	S	R	D	K	S	K	N	T	A	Y	L
Hu 18F7.v6k	G	K	G	L	E	W	V	G	D	I	N	L			D	N	**S**	G	T	H	Y	N	Q	K	F	K	G	R	F	T	I	S	R	D	**K**	S	K	N	T	**A**	Y	L
				*		*	*	*																					*		*		*		*		*	*		*		*

Kabat#	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	##	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
																		Kabat - CDR H3																											
																		Chothia - CDR H3																											
																Contacto - CDR H3																														
hum III	**Q**	**M**	**N**	**S**	**L**	**R**	**A**	**E**	**D**	**T**	**A**	**V**	**Y**	**Y**	**C**	**A**	**R**	**G**															**F**	**D**	**Y**	**W**	**G**	**Q**	**G**	**T**	**L**	**V**	**T**	**V**	**S**	**S**
mu18F7	E	L	H	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	E	G	V	Y	H	D	Y	D	D	Y	A					M	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	A
Hu 18F7.v6	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	G	V	Y	H	D	Y	D	D	Y	A					M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
														*		*	*																			*									

Figura 29

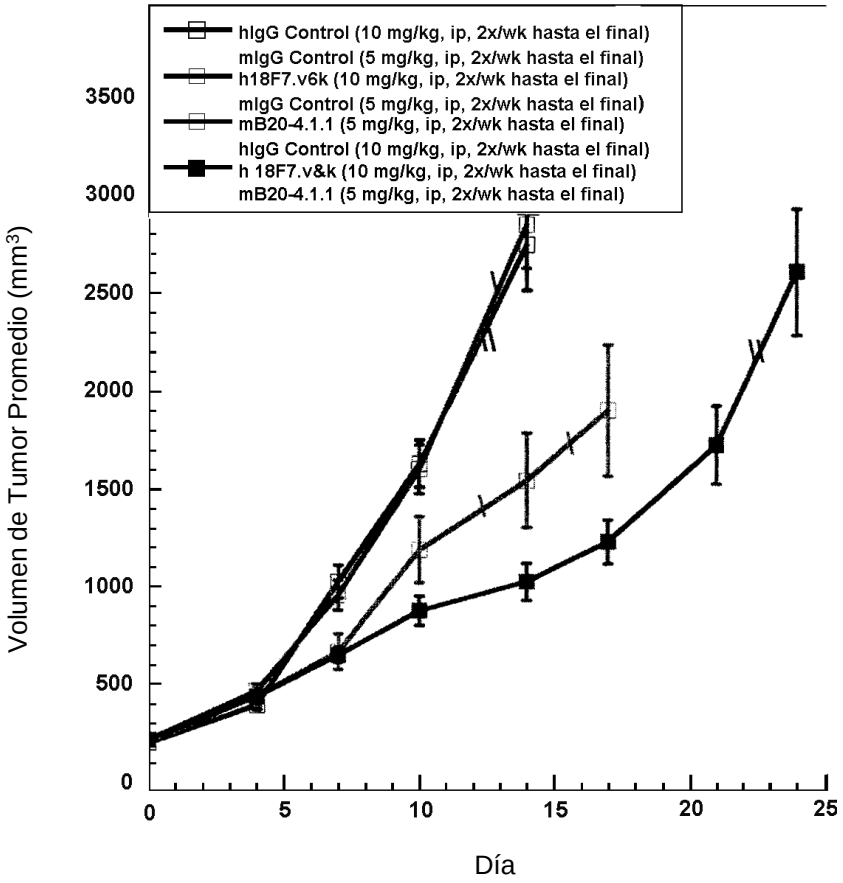
Anti-EGFL/ humanizado MAB h18F7.v6k mejora la eficacia de la terapia anti-VEGF en un modelo de tumor de xenoinjerto H1299 de línea celular de cáncer de pulmón célula no pequeña en humano



Se inyectó a ratones nu/nu hembra HRLN con $1x10^7$ de células de tumor de cáncer de pulmón de células no pequeñas en forma subcutánea y se dejó desarrollar tumores de 80-120 mm^3 de tamaño. Los ratones con tumores luego se separaron en forma aleatoria en cuatro grupos (12 ratones/ grupo) de manera que el volumen de tumor promedio de cada grupo era 122 mm^3. Luego estos ratones se trataron de la siguiente manera: el grupo 1 recibió anti-VEGF Mab (B20.4.1) a 10 mg/kg una vez por semana; el grupo 2 recibió IgG de control (anti-ambrosía) a 10 mg/kg una vez por semana y anti-EGFL Mab (h18f7.v6k) a 10 mg/kg dos veces por semana; el grupo 3 recibió B20.4.1 a 10 mg/kg una vez por semana +h18F7.v6k a 10mg/kg dos veces por semana; el grupo 4 no se trató. Los tumores se midieron dos veces por semana con un calibre y los volúmenes de tumor se calcularon como "w^2 x l/2" mm^3 (w = ancho de tumor en mm, l = longitud de tumor en mm). Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron los 1000 mm3 (esto se define como "los ratones alcanzaron el punto final"). Los volúmenes de tumor (media) promedio de grupo +/-errores estándar (SEM) se graficaron respecto del tiempo hasta que $\geq$50% de los ratones alcanzaron el punto final.

Figura 30

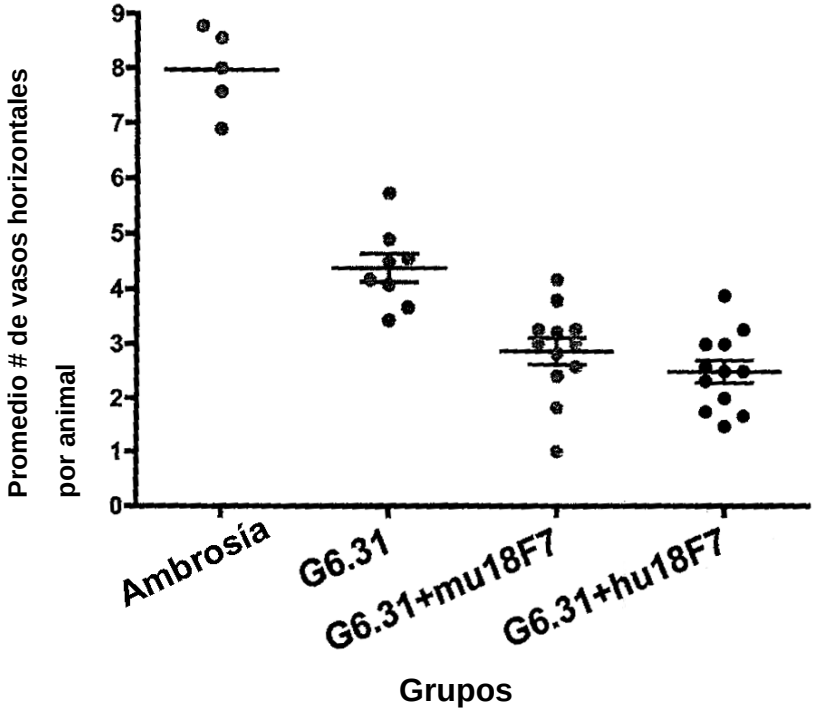
Anti-EGFL-7 + Anti-VEGFA
P80X2- LXFL 1674
Oncotest
Volumen de Tumor Promedio



/= Animal Sacrificado

Figura 31

Cuantificación Vascular de Tráquea: Resultados Agrupados de Tres Experimentos



Valores P (ttest):
G6 vs. G6+mu18f7: 0.0006*
G6 vs. G6+hu18F7: <0.0001*
G6+mu18F7 vs. G6+hu18F7: 0.2618
Ambrosía vs. G6: <0,0001*

(Nota: no todos los animales de control de Ambrosía se cuantificaron

Debido a que la distribución de datos es razonablemente estricta en este grupo).

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

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

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

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

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

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

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

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

Granted and signed in **South San Francisco, California USA**

this 6th day of December 2005

Signature

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