



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 375 191**

⑯ Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
C07K 7/00	(2006.01)
C07K 14/515	(2006.01)
C07K 16/22	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **04759343 .9**

⑯ Fecha de presentación: **08.04.2004**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1615952**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2006**

⑮ Título: **PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS USANDO AGENTES DE UNIÓN ESPECÍFICOS DE LA ANGIOPOYETINA-2-HUMANA.**

⑯ Prioridad:
09.04.2003 US 410998

⑯ Titular/es:
**AMGEN INC.
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.02.2012

⑯ Inventor/es:
**OLINER, Jonathan, Daniel y
MIN, Hosung**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.02.2012

⑯ Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 191 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de tratamiento de enfermedades inflamatorias usando agentes de unión específicos de la angiopoietina-2 humana

5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de EE.UU. con número de serie 10/269,695, presentada el 10 de octubre de 2002, que a su vez reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 60/414.155 presentada el 27 de septiembre de 2002 y la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 60/328.624 presentada el 11 de octubre de 2001.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a agentes de unión específicos que reconocen y se unen a la angiopoietina-2 (Ang-2). Más específicamente, la invención se refiere a la producción, uso diagnóstico, y uso terapéutico de los agentes de unión específica y fragmentos de los mismos, que se unen específicamente a Ang-2

Antecedentes de la invención

15 La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes, es esencial para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Normalmente, la angiogénesis está estrechamente regulada por factores pro- y anti-angiogénicos, pero en el caso de enfermedades tales como cáncer, enfermedades neovasculares oculares, 20 artritis, y psoriasis, el proceso puede fracasar. Folkman, J., Nat. Med., 1:27-31 (1995).

25 Se cree que la angiogénesis desempeña un papel importante en el mantenimiento de la expansión del tejido inflamatorio (pannus) en la artritis reumatoide (Walsh y col., Arthritis Res., 3:147-153 (2001). De hecho, existen numerosas enfermedades que se sabe que están asociadas con la alteración de la regulación de la angiogénesis o la angiogénesis no deseada. Véase Carmeliet y col., Nature 407:249-257 (2000).

30 Tales enfermedades incluyen, entre otras, neovascularización ocular, tales como retinopatías (incluyendo retinopatía diabética), degeneración macular relacionada con la edad, psoriasis, hemangioblastoma, hemangioma, arterioesclerosis, enfermedad inflamatoria, tal como enfermedad inflamatoria reumatoide o reumática, especialmente artritis (incluyendo artritis reumatoide), u otros trastornos inflamatorios crónicos, tales como asma crónica, aterosclerosis arterial después de transplante, endometriosis y enfermedades neoplásicas, por ejemplo los denominados tumores sólidos y tumores líquidos (o hematopoyéticos) (tales como leucemias y linfomas). Otras enfermedades asociadas con la angiogénesis no deseada serán evidentes para los expertos en la técnica.

35 Aunque han estado implicados muchos sistemas de transducción de señal en la regulación de la angiogénesis, uno de los sistemas mejor caracterizados y más selectivos de las células endoteliales implica el receptor tirosina quinasa Tie-2 (denominado "Tie-2" o "Tie-2R" (también denominado "ORK"); Tie-2 murino también denominado "tek") y sus ligandos, las angiopoietinas (Gale, N. W. y Yancopoulos, G. D., Genes Dev. 13:1055-1066 [1999]). Existen 4 angiopoietinas conocidas; desde la angiopoietina-1 ("Ang-1") a la angiopoietina-4 ("Ang-4"). Estas angiopoietinas también se denominan "ligandos de Tie-2". (Davis, S., y col., Cell, 87:1161-1169 [1996]; Grosios, K., y col., Cytogenet Cell Genet, 84:118-120 [1999]; Holash, J., y col., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1617-1625 [1999]; Koblizek, T. I., y col., Current Biology, 8:529-532 [1998]; Lin, P., y col., Proc Natl Acad Sci USA, 95:8829-8834 [1998]; Maisonpierre, P. C., y col., Science, 277:55-60 [1997]; Papa-petropoulos, A., y col., Lab Invest, 79:213-223 [1999]; Sato, T. N., y col., Nature, 375:70-74 [1998]; Shyu, K. G., y col., Circulation, 98:2081-2087 [1998]; Suri, C., y col., Cell, 87:1171-1180 [1996]; Suri, C., y col., Science, 282:468-471 [1998]; Valenzuela, D. M., y col., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96:1904-1909 [1999]; Witzen-bichler, B., y col., J Biol Chem, 273:18514-18521 [1998]). Mientras que la unión de Ang-1 a Tie-2 estimula la fosforilación del receptor en células endoteliales cultivadas, se ha observado que la Ang-2 actúa tanto como agonista como antagonista de la fosforilación del receptor de Tie-2 (Davis, S., y col., [1996], *supra*; Maisonpierre, P.C., y col., [1997], *supra*; Kim, I., J.H. Kim, y col., Oncogene 19 (39): 4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewska, K., P.C. Maisonpierre, y col., Cardiovascular Research 49(3): 659-70 (2001)).

45 Los fenotipos de ratones defectivos en Tie-2 y Ang-1 son similares y sugieren que la fosforilación de Tie-2 estimulada por Ang-1 media la remodelación y estabilización del desarrollo de vasos en el útero mediante el mantenimiento de la adhesión entre las células soporte y las células endoteliales (Dumont, D. J., y col., Genes & Development, 8: 1897 - 1909 [1994]; Sato, T. N., y col., Nature, 376: 70 - 74 [1995]; Suri, C., y col., *ant.*). El papel de la Ang-1 en la estabilización de los vasos se cree que se conserva en el adulto, en el que se expresa amplia y constitutivamente (Hanahan, D., Science, 277: 48 - 50 [1997]; Zagzag, D., y col., Experimental Neurology, 159: 391 - 400 [1999]). Por el contrario, la expresión de Ang-2 está principalmente limitada a sitios de remodelación vascular, en los que se cree que bloquea la función de Ang-1, de modo que se induce un estado de plasticidad vascular que conduce a la angiogénesis (Hanahan, D., [1997], *ant.*; Holash, J., y col., Science, 284:1994-1998 [1999]; Maisonpierre, P. C., y col., [1997], *supra*).

50 Numerosos estudios publicados han demostrado supuestamente la expresión de Ang-2 selectiva de los vasos en estados patológicos asociados con la angiogénesis. Estas afecciones patológicas incluyen, por ejemplo, psoriasis, degeneración macular, y cáncer (Bunone, G., et al., American Journal of Pathology, 155:1967-1976 [1999]; Etoh, T.,

y col., Cancer Research, 61:2145-2153 [2001]; Hangai, M., y col., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1617-1625 [2001]; Holash, J., y col., ant.; Kuroda, K., y col., Journal of Investigative Dermatology, 116:713-720 [2001]; Otani, A., y col., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40:1912-1920 [1999]; Stratmann, A., y col., American Journal of Pathology, 153:1459-1466 [1998]; Tanaka, S., y col., J Clin Invest, 103:34-345 [1999]; Yoshida, Y., y col., International Journal of Oncology, 15:1221-1225 [1999]; Yuan, K., y col., Journal of Periodontal Research, 35:165-171 [2000]; Zagzag, D., y col., ant.). La mayoría de estos estudios se han centrado en el cáncer, en el que muchos tipos de tumores parecen mostrar la expresión de Ang-2 vascular. Al el contrario que su expresión en la angiogénesis patológica, la expresión de Ang-2 en tejidos normales está extremadamente limitada (Maisonneuve, P. C., y col., [1997], ant.; Mezquita, J., y col., Biochemical and Biophysical Research Communications, 260:492-498 [1999]). En el adulto normal, los tres sitios principales de angiogénesis son el ovario, la placenta y el útero; éstos son los tejidos primarios en los tejidos normales (es decir, no cancerosos) en los que se ha detectado ARNm de Ang-2.

Ciertos estudios funcionales sugieren que la Ang-2 puede estar implicada en la angiogénesis tumoral. Ahmad y col. (Cancer Res., 61:1255-1259 [2001]) describen la sobreexpresión de Ang-2 y muestran su supuesta asociación con un incremento del desarrollo del tumor en un modelo de xenoinjerto de ratón. Véase también Etoh y col., ant., y Tanaka y col., ant., en el que los datos presentan una asociación supuesta de la sobreexpresión de Ang-2 con la hipervascularesidad del tumor. No obstante, por el contrario, Yu y col. (Am. J. Path., 158:563-570 [2001]) dan a conocer datos que muestran que la sobreexpresión de Ang-2 en las células de carcinoma de pulmón de Lewis y células de carcinoma de mama TA3 supuestamente prolongan la supervivencia de los ratones a los que se ha inyectado los transfectantes correspondientes.

En los últimos años, diversas publicaciones han sugerido Ang-1, Ang-2 y/o Tie-2 como posibles dianas para la terapia anticáncer. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 6,166,185, 5,650,490, y 5,814,464 describen cada una el concepto de anticuerpos de ligando anti-Tie-2 y los anticuerpos del receptor. Lin y col. (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95:8829-8834 [1998]) inyectaron un adenovirus que expresaba Tie-2 soluble en ratones; el Tie-2 soluble supuestamente disminuyó el número y tamaño de los tumores desarrollados por los ratones. En un estudio relacionado, Lin y col. (J. Clin. Invest., 100: 2072 - 2078 [1997]) inyectaron una forma soluble de Tie-2 en ratas; este compuesto redujo supuestamente el tamaño del tumor en las ratas. Siemeister y col. (Cancer Res., 59: 3185-3189 [1999]) generaron líneas celulares de melanoma humano que expresan el dominio extracelular de Tie-2, inyectaron estas líneas celulares en ratones atípicos y concluyeron que el Tie-2 soluble supuestamente dio como resultado una "inhibición significativa" del crecimiento de tumor y de la angiogénesis tumoral. En vista de esta información, y dado que tanto Ang-1 como Ang-2 se unen a Tie-2, no está claro a partir de estos estudios si Ang-1, Ang-2, o Tie-2 serían dianas atractivas para la terapia anti-cáncer.

La fusión de ciertos péptidos a una proteína plasmática estable, tal como una región constante de Ig para mejorar la semivida de estas moléculas se ha descrito en, por ejemplo, la publicación PCT WO 00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000.

La fusión de una proteína o un fragmento de la misma a una proteína plasmática estable tal como una región constante de Ig para mejorar la semivida de estas moléculas se ha descrito de diversas maneras (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.480.981; Zheng y col., J. Immunol., 154:5590-5600, (1995); Fisher y col., N. Engl. J. Med., 334:1697-1702, (1996); Van Zee, K. y col., J. Immunol., 156:2221-2230, (1996); Patente de Estados Unidos 5.808.029, emitida el 15 de septiembre de 1998; Capon y col., Nature, 337:525-531, (1989); Harvill y col., Immunotech. 1:95-105, (1995); el documento WO 97/23614, publicado el 3 de Julio de 1997; el documento WO/9828427 publicado el 2 de julio de 1998 ; Linsley, J. Exp. Med., 174:561-569, (1991); publicado el WO 95/21258, publicado el 10 de agosto de 1995). El documento WO/57901 publicado el 5 de octubre de 2000 divulga el uso de anticuerpos neutralizantes anti-ang-2 en la disminución de la permeabilidad vascular y/o el control de la pérdida de plasma.

Una terapia eficaz anti-Ang-2 podría beneficiar a una amplia población de pacientes de cáncer debido a que la mayoría de los tumores sólidos requieren neovascularización para crecer más allá de 1 - 2 milímetros de diámetro. Tal terapia puede tener mayor aplicación en otras enfermedades asociadas con angiogénesis también, tales como retinopatías, artritis, y psoriasis.

Existe una necesidad no desarrollada de identificar nuevos agentes que reconozcan de manera específica y se unan a Ang-2. Tales agentes serían útiles para la selección diagnóstica e intervención terapéutica en los estados patológicos que están asociados con la actividad de la Ang-2.

De acuerdo con lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes de unión específicos de Ang-2 que modulan la actividad de la Ang-2. Tales agentes de la presente invención toman la forma de peptícueros, es decir, péptidos condensados a otras moléculas, tales como un dominio Fc de un anticuerpo, en el que el resto péptido se une específicamente a Ang-2

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a una realización para péptidos (también denominados polipéptidos en el presente documento) que se unen a la Ang-2, que comprende la secuencia como se indica en la SEC ID N° 25 en combinación con un agente antiinflamatorio para usar en un procedimiento de tratar una enfermedad inflamatoria.

Los péptidos de la presente invención pueden estar unidos a vehículos.

Los péptidos pueden estar condensados a dominios Fc, proporcionando de este modo pepticuerpos.

Se apreciará que la invención pueda estar relacionada con un polipéptido de fusión que comprende al menos un péptido como se ha descrito en el presente documento y un vehículo, en el que el polipéptido de fusión es capaz de unirse a Ang-2, y sales fisiológicamente aceptables de los mismos. En el polipéptido de fusión, el vehículo es, preferentemente, al menos uno de un dominio Fc, polietilenglicol, un lípido, un grupo de colesterol, un hidrato de carbono y un oligosacárido. Los expertos en la técnica apreciarán otros vehículos adecuados, tales como albúmina y similares, y están abarcados por el alcance de la presente invención.

Los expertos en la técnica reconocerán que diversas moléculas se pueden insertar en la estructura del agente de unión específico. Por tanto se puede insertar una molécula dada, por ejemplo, entre las porciones de péptido y vehículo de los agentes de unión específicos o se pueden insertar dentro de la propia porción de péptido, al tiempo que conserva la actividad deseada del agente de unión específico. Se pueden insertar fácilmente, por ejemplo, moléculas tales como un dominio Fc o su fragmento, polietilenglicol u otras moléculas relacionadas, tales como dextrano, un ácido graso, un lípido, un grupo colesterol, un hidrato de carbono pequeño, un péptido, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un resto detectable como se describe en el presente documento (incluidos agentes fluorescentes, radiomarcadores, tales como radioisótopos), un oligosacárido, oligonucleótido, un polinucleótido, ARN de interferencia (u otro), enzimas, hormonas, o similares. Los expertos en la técnica apreciarán otras moléculas adecuadas para insertar de este modo y están abarcadas por el alcance de la presente invención. Esto incluye la inserción de, por ejemplo, una molécula deseada entre dos aminoácidos consecutivos, unidos opcionalmente mediante un enlazador adecuado A modo de ejemplo, en la secuencia de pepticuerpo Con4(C):

M-Fc-GGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEC ID Nº 23)

Un experto en la técnica podría insertar fácilmente una molécula deseada entre, por ejemplo, los dos residuos de glutamina adyacentes ("QQ") para lograr una estructura y/o función deseada, al tiempo que conservan la capacidad del péptido de unirse a Ang-2. De este modo, esta secuencia se puede modificar como sigue:

M-Fc-GGGGAQ-[molécula]-QEECEWDPWTCEHMLE

Se pueden añadir moléculas enlazadoras adecuadas si se desea. Además, se apreciará que se puede insertar la molécula en un número de localizaciones sobre la molécula, incluido sobre cadenas laterales adecuadas, entre la secuencia del vehículo y el péptido como sigue:

M-Fc-[molécula]-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE

o en cualquier otro lugar deseado por un experto en la técnica. Otras realizaciones adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica.

Se apreciará que la invención se refiere al uso del pepticuerpo de la invención en procedimientos para tratar la enfermedad inflamatoria usando los agentes de unión específicos, descritos en el presente documento, y que además comprende administrar al menos un agente inflamatorio. En una realización preferida, el agente antiinflamatorio puede comprender al menos uno de un DMARD, SARRD y AINE. En otra realización preferida, el agente antiinflamatorio puede comprender al menos uno de un inhibidor de TNF, un inhibidor de IL-1, un inhibidor de TACE, un inhibidor de COX-2 y un inhibidor de P-38. En otra realización preferida más, el inhibidor de TNF comprende al menos uno de etanercept, adalimumab, pegasunercept (PEG sTNF-R1), onercept e infliximab. En otra realización preferida más, el inhibidor de IL-1 pide ser al menos uno de anakinra, IL-1 TRAP, anticuerpo de IL-1 y receptor de IL-1 soluble.

Como se ha descrito en el presente documento, se apreciará que la administración puede ser administración concurrente o administración no concurrente.

La invención se refiere al uso de un pepticuerpo, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID Nº 25, en un procedimiento para tratar una enfermedad inflamatoria, que comprende la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido o pepticuerpo capaz de unir la Ang-2. El uso comprende además administrar al menos un agente antiinflamatorio. La administración puede ser administración concurrente o administración no concurrente.

Otras realizaciones de la presente invención serán fácilmente evidentes a partir de la divulgación proporcionada con la presente,

50 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 representa un gráfico del volumen del tumor (eje y) frente al tiempo (eje x) en ratones portadores del tumor A-431 tratados con pepticuerpo TN8-Con4- C de la presente invención, o con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los detalles se describen en los Ejemplos.

- La figura 2 representa un gráfico de concentración de pepticuerpo (eje y) frente al tiempo después de la dosis (eje x) en ratones de tipo salvaje tratados con una dosis de 50 µg de o bien 2xCon4-C, L1 -7-N o pepticuerpo L1 -21-N. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 5 La figura 3 representa un gráfico del volumen del tumor (eje y) frente al tiempo (eje x) en ratones portadores del tumor A-431 tratados con pepticuerpo 2xCon4-C de la presente invención, o con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o con el pepticuerpo control. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- La figura 4 muestra un gráfico que representa el crecimiento *in vitro* de células A431 cultivadas tratadas con el pepticuerpo Con4-C de acuerdo con la presente invención, pepticuerpo control, o sin tratar. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 10 La figura 5 representa un gráfico del volumen del tumor (eje y) frente al tiempo (eje x) en células de tumor Colo205 tratadas con pepticuerpo Con4-C, pepticuerpo L1-7-N, pepticuerpo L1-21 -N o pepticuerpo 2xCon4-C de acuerdo con la presente invención, o con solución salina tamponada con fosfato (PBS), anticuerpo anti-Ang-2 (Ab536), o Fc. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 15 La figura 6 representa un gráfico del volumen del tumor (eje y) frente al tiempo (eje x) en ratones portadores del tumor de xenoinjerto Colo205 tratados con dosis variables de pepticuerpo 2xCon4-C de acuerdo con la presente invención, o con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o Fc. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 20 La figura 7 representa un gráfico del volumen del tumor (eje y) frente al tiempo (eje x) en ratones portadores del tumor de xenoinjerto Colo205 tratados con pepticuerpo 2xCon4-C de acuerdo con la presente invención, o con pepticuerpos control. La figura 7 también muestra un gráfico de área de tumor teñida con CD31/área total tumor para estos pepticuerpos. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 25 La figura 8 representa un gráfico del volumen del tumor (eje y) frente al tiempo (eje x) en ratones portadores del tumor de aloinjerto colo205 tratados con pepticuerpo 2xCon4-C de acuerdo con la presente invención, o con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o con el pepticuerpo control. Los detalles se describen en los Ejemplos. Este gráfico muestra que los pepticuerpos anti-Ang- 2 son capaces de inhibir el crecimiento del tumor Colo205 independiente de cuando comience la dosis.
- 30 La figura 9 muestra un resumen de las velocidades de respuesta completa (RC) obtenidas en ratones hembra atípicos usando el anticuerpo Ab536 o con pepticuerpo 2xCon4-C, tanto en los modelos A431 como de xenoinjerto Colo-205. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- La figura 10A representa un gráfico del volumen del tumor (eje y) frente al tiempo (eje x) en ratones portadores del tumor de aloinjerto Colo205 tratados con pepticuerpo 2xCon4-C de acuerdo con la presente invención, o con una combinación de 2xCon4-C y taxotere, o con solución salina tamponada con fosfato (PBS), o con PBS más taxotere. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 35 La figura 10B representa un gráfico del volumen del tumor (eje y) frente al tiempo (eje x) en ratones portadores del tumor de aloinjerto Colo205 tratados con pepticuerpo 2xCon4-C de acuerdo con la presente invención, o con una combinación de 2xCon4-C y 5-FU, o con solución salina tamponada con fosfato (PBS), o con PBS más 5-FU. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 40 La figura 11A representa un gráfico de los niveles de inflamación de la pata (AUC-CSE) en un modelo de artritis inducida por adyuvante en ratas tratadas con pepticuerpo 2xCon4-C de acuerdo con la presente invención, o con solución salina tamponada con fosfato (PBS), o con pepticuerpo control, o controles normales o de artritis. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 45 La figura 11B representa un gráfico de la densidad mineral de hueso (DMO) en un modelo de artritis inducida por adyuvante en ratas tratadas con pepticuerpo 2xCon4-C de acuerdo con la presente invención, o con solución salina tamponada con fosfato (PBS), o con pepticuerpo control, o controles normales o de artritis. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- La figura 11C muestra un gráfico del cambio en el peso corporal en un modelo de artritis inducida por adyuvante en ratas tratadas con pepticuerpo 2xCon4-C de acuerdo con la presente invención o con solución salina tamponada con fosfato (PBS), o con pepticuerpo control, o controles normal o de artritis. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 50 La figura 12 muestra dos gráficos que representan la inhibición de la angiogénesis de córnea inducida por VEGF en ratas. El primer gráfico muestra el número de vasos sanguíneos medido en ratas tratadas con albúmina sérica bovina (BSA), VEGF más solución salina tamponada con fosfato (PBS), o VEGP más pepticuerpo Con4-C de la invención El segundo gráfico muestra el área de vasos sanguíneos (mm^2) en ratas tratadas con BSA, VEGF más solución salina tamponada con fosfato (PBS), o VEGF más pepticuerpo Con4-C de la invención. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 55

La figuras 13A, 13B, y 13C muestran los datos de mapeo del epítopo (D. O. 370) para la Ang-2 humana de longitud completa (hAng-2), al extremo N de hAng-2 y al extremo C de hAng-2, respectivamente, para los pepticuerpos TN8- Con4-C, L1-7-N, y 12-9-3-C de acuerdo con la invención, así como para el pepticuerpo control, Tie2-Pc, C2B8, o 5B 12. Los detalles se describen en los Ejemplos.

- 5 La figura 14 representa la afinidad de unión (KD) del pepticuerpo 2xCon-4-C de acuerdo con la invención, usando el ensayo Sapidyne KinExA. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- La figura 15 representa los efectos del pepticuerpo 2xCon-4-C y del agente antiinflamatorio PEG sTNF-R1 sobre la inflamación de la pata en arthritis aduvante de ratas. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 10 La figura 16 representa los efectos del pepticuerpo 2xCon-4-C y del agente antiinflamatorio PEG sTNF-R1 sobre la inflamación de la pata AUC en arthritis aduvante de ratas. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- La figura 17 representa los efectos del pepticuerpo 2xCon-4-C y del agente antiinflamatorio PEG sTNF-R1 sobre el peso corporal en arthritis aduvante de ratas. Los detalles se describen en los Ejemplos.

Descripción detallada de la invención

15 Los encabezados de sección usados en el presente documento son únicamente con motivos organizativos y no deben interpretarse de ningún modo como limitantes de la materia objeto descrita.

20 Se pueden usar técnicas estándar para producción de moléculas de ADN recombinante, proteínas y anticuerpos, así como para cultivo de tejidos y transformación celular. Normalmente se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como normalmente se efectúan en la técnica usando procedimientos convencionales tales como los que se indican en Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989]), o como se ha descrito en el presente documento. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura usada en relación con la química analítica, la química orgánica sintética y la química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento y los procedimientos y técnicas de laboratorio descritos en el presente documento son los bien conocidos y usados habitualmente en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y liberación, y tratamiento de pacientes.

Definiciones

Los términos usados en la presente memoria descriptiva se definen como sigue, salvo que se limite de otra manera en los casos específicos.

30 El término "Ang-2" se refiere al polipéptido establecido en La figura 6 de la patente de Estados Unidos Noº 6.166.185 ("ligando-2 de Tie-2") o fragmentos de los mismos, así como a los polipéptidos relacionados que incluyen variantes alélicas, variantes de corte y empalme, derivados, variantes de substituciones, delecciones y/o de inserción, péptidos de fusión y polipéptidos, y homólogos entre especies. El polipéptido Ang-2 puede o no incluir residuos terminales adicionales, *por ejemplo*, secuencias líder, secuencias de dirección, metionina amino terminal, residuos de metionina amino terminal, y lisina, y/o secuencias de proteínas de etiqueta o de fusión, dependiendo de la manera en la que se prepara.

35 El término "biológicamente activo" cuando se usa en relación con Ang-2 o un agente de unión específico de Ang-2 se refiere a un péptido o polipéptido que tiene al menos una actividad característica de Ang-2 o de un agente de unión específico de Ang-2. Un agente de unión específico de Ang-2 puede tener actividad agonista, antagonista, o neutralizante o bloqueante con respecto a al menos una actividad biológica de Ang-2.

40 La expresión "agente de unión específico" se refiere a una molécula, preferiblemente una molécula proteinácea, que se une específicamente a Ang-2, y sus variantes y derivados, como se define en el presente documento. Un agente de unión específico puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido o compuesto de peso molecular pequeño que se une preferentemente a Ang-2. En una realización preferida, el agente de unión específico de acuerdo con la presente invención es un péptido o un pepticuerpo, así como sus fragmentos, variantes o derivados, o bien solos o en combinación con otras secuencias de aminoácidos, proporcionadas por técnicas conocidas. Dichas técnicas incluyen, entre otras, escisión enzimática, escisión química, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes. Los agentes de unión específica anti-Ang-2 de la presente invención son capaces de unirse a porciones de Ang-2 que modulan, por ejemplo inhiben o estimulan, la actividad biológica de Ang-2 y/u otras actividades asociadas con la Ang-2.

45 50 El término "variantes," como se usa en el presente documento, incluyen aquellos péptidos y polipéptidos en los que los residuos aminoácidos se insertan en, se delecionan de y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos natural (o al menos una conocida) para el agente de unión. Las variantes de la invención incluyen proteínas de fusión como se describe más adelante.

55 "Derivados" incluyen los agentes de unión que se han modificado de manera química de alguna manera distinta a la de las variantes de inserción, delección o substitución.

"Especificamente se une a Ang-2" se refiere a la capacidad de un agente de unión específico (tal como un pepticuerpo, o una porción de péptido del mismo) de la presente invención para reconocer y unirse al polipéptido Ang-2 humano de longitud completa, o de longitud parcial, maduro, o un ortólogo, de manera que su afinidad (como se determina mediante, *por ejemplo*, ensayos de ELISA de afinidad o BIAcore como se describe en el presente documento) o su capacidad de neutralización (como se determina mediante *por ejemplo*, ensayos de ELISA de Neutralización descritos en el presente documento, o ensayos similares) sea al menos 10 veces tan grande, pero opcionalmente 50 veces tan grande, 100, 250 o 500 veces tan grande, o incluso al menos 1000 tan grande como la capacidad de afinidad o neutralización de la misma por cualquier otra angiopoyetina u otro péptido o polipéptido, en la que la porción de péptido del pepticuerpo está primero condensado a un resto Fc para evaluación en tal ensayo.

5 10 El término "epítopo" se refiere a dicha porción de cualquier molécula capaz de ser reconocida por, y unirse a, un agente de unión específico, *por ejemplo*, un pepticuerpo, en una o más de las regiones de unión de antígeno del agente de unión. Los epítopos normalmente constan de grupos de superficie químicamente activos de moléculas, tales como, por ejemplo, aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales, específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos, como se usa en el 15 presente documento, pueden ser contiguos o no contiguos.

20 25 La expresión "epítopo de inhibición y/o neutralización" es un epítopo que, cuando se une mediante un agente de unión específico, tal como un pepticuerpo, da como resultado la pérdida de (o al menos la disminución) la actividad biológica de la molécula, célula, u organismo que contiene tal epítopo, *in vivo*, *in vitro*, o *in situ*. En el contexto de la presente invención, el epítopo de neutralización se localiza en o está asociado con una región biológicamente activa de Ang-2. Como alternativa, el término "epítopo de activación" es un epítopo, que cuando se une mediante un agente de unión específico de la invención, tal como un anticuerpo, da como resultado la activación, o al menos el mantenimiento, de una conformación biológicamente activa, de Ang-2.

30 35 El término "fragmento de pepticuerpo" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de un pepticuerpo completo, intacto.

40 45 El término "de origen natural", cuando se usa junto con los materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped y similares, se refiere a aquellos que se encuentran en la naturaleza y no están modificados por un ser humano.

50 55 El término "aislado", cuando se usa en relación con la Ang-2 o con un agente de unión específico de Ang-2, se refiere a un compuesto que está libre de al menos un polipéptido o compuesto contaminante que se encuentra en su ambiente natural, y, preferentemente, sustancialmente libre de cualequier otro polipéptido contaminante de mamífero que interferiría con su uso terapéutico o diagnóstico.

60 65 El término "maduro", cuando se usa en relación con el pepticuerpo de Ang-2 o un fragmento del mismo, o con cualquier otro agente de unión específico proteináceo de Ang-2 se refiere a un péptido o un polipéptido que carece de una secuencia líder o señal. Cuando un agente de unión de la invención se expresa, por ejemplo, en una célula huésped procariótica, el péptido o polipéptido "maduro" también puede incluir residuos de aminoácidos adicionales (pero que todavía carecen de la secuencia líder), tal como una metionina amino terminal, o uno o más residuos de metionina y lisina. Un péptido o polipéptido producido de esta manera puede utilizarse con o sin estos residuos de aminoácidos adicionales que se han eliminado.

70 75 Las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" cuando se usa en relación a un agente de unión específico de Ang-2 se refiere a una cantidad de un agente de unión específico que es útil o necesario para apoyar un cambio observable en el nivel de una o más actividades biológicas de Ang-2. El cambio puede ser o bien un incremento o bien una disminución en el nivel de la actividad de Ang-2. Preferentemente, el cambio es una disminución en la actividad de Ang-2.

80 85 El término "pepticuerpo" se refiere a una molécula que comprende un dominio Fc de anticuerpo unido a al menos un péptido. La producción de pepticuerpos está descrita, en general, en la publicación PCT WO 00124782, publicada el 4 de mayo de 2000.

90 95 El término "variantes," como se usa en el presente documento, incluyen las moléculas, tales como péptidos o combinaciones de péptido-vehículo, tales como pepticuerpos de la presente invención, en los que los residuos de aminoácidos están insertados en, delecionados de y/o sustituidos en la secuencia de aminoácidos para tales moléculas. Las variantes que tienen uno o más aminoácidos insertados incluyen proteínas de fusión como se describe más adelante.

"Derivados" incluyen los péptidos y/o combinaciones de péptido-vehículo, tal como pepticuerpos, que se han modificado de manera química de alguna manera distinta a la de las variantes de inserción, delección o sustitución.

100 105 El término "fragmento" se refiere a un péptido o combinación de péptido-vehículo que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de tales péptidos y/o combinaciones de péptido-vehículo. Tal fragmento puede surgir, por ejemplo, a partir de un truncamiento en el extremo amino, un truncamiento en el extremo carboxi y/o una delección interna de un residuo(s) de la secuencia de aminoácidos del péptido o combinación

de péptido-vehículo. Los fragmentos se pueden producir a partir de un corte y empalme de ARN alternativo o de la actividad de la actividad proteasa *in vivo* o *in vitro*. Tales fragmentos también se pueden construir mediante procedimientos de síntesis química de péptidos o mediante modificación de un polipéptido que codifica un péptido, una combinación de péptido-vehículo, o una porción de Fc y/o porción de péptido de un pepticuerpo.

5 El término "Fc" se refiere a un tipo de vehículo de la presente invención y comprende la secuencia de un fragmento de unión no antigenógeno de un anticuerpo que se produce a partir de la digestión proteolítica de un anticuerpo entero, bien en forma monomérica o bien multimérica. La fuente del Fc en la presente invención es preferentemente Fc completamente humano, y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren la IgG1 y la IgG2. Sin embargo, también se incluyen en el presente documento moléculas de Fc que son parcialmente humanas, o se han obtenido de especies no humanas. Los Fc están formados por polipéptidos monoméricos que pueden estar unidos en formas diméricas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativas varía entre 1 y 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgG2A). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido a disulfuro que se produce a partir de la digestión con papaína de una IgG [véase Ellison y col. (1982), Nucl. Acids. Res. 10: 4071-9]. El término "Fc nativo", como se usa en el presente documento, es genérico para las formas monomérica, dimérica, y multimérica.

El término "dominio Fc" abarca el Fc nativo y las moléculas y secuencias variantes de Fc como se ha definido anteriormente. Como con las variantes de Fc y Fc nativos, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, o bien digeridas a partir de anticuerpo completo o producidas por otros medios.

20 El término "multímero", como se aplica a los dominios Fc o moléculas que comprenden dominios Fc se refiere a moléculas que tienen dos o más cadenas de polipéptidos asociadas de manera covalente, no covalente, o mediante otras interacciones covalentes y no covalentes. Habitualmente, las moléculas de IgG forman dímeros; las de IgM, pentámeros; las de IgD, dímeros; y las de IgA, monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros. Los polímeros se pueden formar mediante la explosión de la secuencia y la actividad resultante de la fuente de Ig nativa del Fc o mediante derivatización (como se define más adelante) de tal Fc nativo.

25 El término "dímero", como se aplica a los dominios Fc o moléculas que comprenden dominios Fc, se refiere a moléculas que tienen dos o más cadenas de polipéptidos asociadas de manera covalente o no covalente.

30 El término "vehículo" se refiere a una molécula que evita la degradación y/o incrementa la semivida, reduce la toxicidad, reduce la inmunogenicidad o incrementa la actividad biológica de una proteína terapéutica. Ejemplos de vehículos incluyen un dominio de Fc, así como un polímero lineal (*por ejemplo*, polietilenglicol (PEG), polilisina, dextrano, etc.); un polímero de cadena ramificada (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.289.872 de Denkenwalter y col., emitida el 15 de septiembre de 1981; la Patente de Estados Unidos Nº 5.229.490 de Tam, emitida el 20 julio de 1993; el documento WO 9321259 de Frechet y col., publicada el 28 de octubre de 1993); un lípido, un grupo de colesterol (tal como un esteroide); un hidrato de carbono u oligosacárido; o cualquier proteína, polipéptido o péptido natural o sintético, que se une a un receptor de rescate. Los vehículos se describen adicionalmente más adelante en el presente documento.

35 Los términos "derivatización" y "derivado" o "derivatizado" comprenden procedimientos y compuestos resultantes respectivamente en los que (1) el compuesto tiene una porción cíclica; por ejemplo, reticulación entre residuos cde cisteinilo dentro del compuesto; (2) el compuesto está reticulado o tiene un sitio de reticulación; por ejemplo, el compuesto tiene un residuo cisteinilo y, de esta manera, forma dímeros reticulados en cultivo o *in vivo*; (3) uno o más enlaces peptídico está reemplazado por un enlace no peptídico; (4) el extremo N está reemplazado por -NRR¹, NRC(O)R¹, -NRC(O)OR¹, -NRS(O)₂R¹, -NHC(O)NHR, un grupo succinimida, o benciloxicarbonil-NH- sustituido o no sustituido, en los que R y R¹ y los sustituyentes de anillo son como se definen en el presente documento más adelante; (5) el extremo C está reemplazado por -C(O)R² o -NR³R⁴ en los que R², R³ y R⁴ son como se definen en el presente documento más adelante; y (6) los compuestos en los que los restos aminoácidos individuales están modificados mediante tratamiento con agentes capaces de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. Los derivados se describen adicionalmente más adelante en el presente documento.

40 El término "péptido" se refiere a moléculas de aproximadamente 3 a aproximadamente 75 aminoácidos, siendo las moléculas de aproximadamente 5 a 50 las preferidas, de 8 a 40 más preferidas, y las de aproximadamente 10 a 25 aminoácidos las más preferidas. Los péptidos pueden ser secuencias de aminoácidos de origen natural o artificiales (*es decir* de origen no natural). Ejemplos de péptidos se pueden generar mediante cualquiera de los procedimientos establecidos en el presente documento, tales como los incluidos en una genoteca de péptidos (*por ejemplo*, una genoteca de expresión en fagos), generados mediante síntesis química, derivados mediante digestión de proteínas o generados usando técnicas de ADN recombinante.

45 55 La expresión "farmacológicamente activo" significa que una sustancia así descrita se determina que tiene actividad que afecta a un parámetro médico (por ejemplo, presión arterial, recuento de células sanguíneas, nivel de colesterol) o estado patológico (*por ejemplo*, cáncer, trastornos autoinmunes, etc.).

Los términos "péptido antagonista" o "péptido inhibidor" se refieren a un péptido que bloquea o, de alguna forma interfiere, con la actividad biológica de la proteína asociada de interés, o tiene actividad biológica comparable con un

antagonista o inhibidor conocido de la proteína asociada de interés. De este modo, el término "péptido antagonista de Ang-2" comprende los péptidos que pueden identificarse o derivarse por tener características antagonistas de Ang-2.

5 De manera adicional, las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de la presente invención también están comprendidos en el presente documento. Por "sales fisiológicamente aceptables" se quiere decir cualquier sal que se conoce o se ha descubierto posteriormente que es farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos específicos son: acetato; trifluoroacetato; hidrohaluros, tales como hidrocloruro e hidrobromuro; sulfato; citrato; tartrato; glicolato; y oxalato, mesilato, y fosfato.

Pepticuerpos

10 Un aspecto de la presente invención se refiere al desarrollo de pepticuerpos de Ang-2. La interacción de un ligando de proteína con su receptor a menudo tiene lugar en una interfaz relativamente grande. Sin embargo, como se ha demostrado para la hormona de crecimiento humana y su receptor, solamente unos pocos residuos clave en la internaz contribuyen a la mayoría de la energía de unión. Clackson y col., *Science* 267: 383-6 (1995). La mayor parte del ligando de proteína solamente muestra los epítopos de unión en la correcta tipología o sirve para funciones no relacionadas con la unión. De este modo, las moléculas de solamente "péptido" de longitud (en general de 2 a 40 aminoácidos) se pueden unir a la proteína receptora de un ligando de proteína grande dado. Tales péptidos pueden imitar la bioactividad de los ligandos de proteína grande ("agonistas de péptido") o mediante unión competitiva, inhiben la bioactividad del ligando de proteína grande ("antagonistas de péptido").

20 La tecnología de expresión en fagos ha surgido como un procedimiento potente en la identificación de tales agonistas y antagonistas de péptido. Véase, por ejemplo, Scott y col. *Science* 249: 386 (1990); Devlin y col., *Science* 249: 404 (1990); la patente de EE.UU. nº 5.223.409, emitida el 29 de junio de 1993; la patente de EE.UU. nº 5.733.731, emitida el 31 de marzo de 1998; la patente de EE.UU. nº 5.498.530, emitida el 12 de marzo de 1996; la patente de EE.UU. nº 5.432.018, emitida el 11 de Julio de 1995; la patente de EE.UU. nº 5.338.665, emitida el 16 de agosto de 1994; la patente de EE.UU. nº 5.922.545, emitida el 13 de Julio de 1999; el documento WO 96/40987, publicado el 19 de diciembre de 1996; y el documento WO 98/15833, publicado el 16 de abril de 1998 (cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia). En las genotecas de expresión en fagos de péptidos, se pueden expresar secuencias de péptidos al azar mediante fusión con proteínas de recubrimiento de fago filamentoso. Los péptidos expresados pueden eluir por afinidad contra un dominio extracelular inmovilizado por anticuerpo de un receptor, si se desea. El fago retenido se puede enriquecer mediante rondas sucesivas de purificación por afinidad y repropagación. Los mejores péptidos de unión se pueden secuenciar para identificar los residuos clave dentro de una o más familias de péptidos relacionadas estructuralmente. Véase, por ejemplo, Cwirla y col., *Science*, 276: 1696-9 (1997), en la que se identificaron dos familias distintas. Las secuencias de péptidos también pueden sugerir qué residuos se pueden reemplazar de un modo seguro mediante exploración de alanina o mediante mutagénesis al nivel de ADN. Se pueden crear genotecas de mutagénesis y seleccionarse para optimizar adicionalmente la secuencia de los mejores enlazadores. Lowman, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 401-24 (1997).

30 También se puede usar el análisis estructural de la interacción proteína - proteína para sugerir los péptidos que imitan la actividad de unión de ligandos de proteínas grandes. En tal análisis, la estructura cristalina puede sugerir la identidad y orientación relativa de los residuos críticos del ligando de proteína grande, a partir de los cuales se puede diseñar un péptido. Véase, por ejemplo, Takasaki y col., *Nature Biotech* 15: 1266-70 (1997). Estos procedimientos analíticos también se pueden usar para investigar la interacción entre una proteína receptora y los péptidos seleccionados mediante expresión en fagos, que pueden sugerir además la modificación de los péptidos para incrementar la afinidad de unión.

40 Otros procedimientos compiten con la expresión en fagos en la investigación de péptidos. Una genoteca de péptido puede condensarse con el extremo carboxilo del represor lac y expresarse en *E. coli*. Otro procedimiento basado en *E. coli* permite la expresión en la membrana exterior de las células mediante fusión con una lipoproteína asociada con peptidoglicano (PAL). En lo sucesivo en el presente documento, éstos y los procedimientos relacionados se denominan de manera conjunta "expresión en *E. coli*." En otro procedimiento, la traducción de ARN aleatorio se detiene antes de la liberación del ribosoma, lo que tiene como resultado una genoteca de polipéptidos con su ARN asociado todavía unido. En lo sucesivo en el presente documento, éstos y los procedimientos relacionados se denominan de manera conjunta "expresión en *ribosoma*". Otros procedimientos emplean el enlace químico de los péptidos al ANR. Véase, por ejemplo, Roberts and Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-303 (1997). En lo sucesivo en el presente documento, éste y los procedimientos relacionados se denominan de manera conjunta "detección selectiva de ARN-péptido". Se han desarrollado bibliotecas de péptidos derivados químicamente en las que los péptidos están inmovilizados sobre materiales no biológicos estables, tales como rodillos "e polietileno o resinas permeables a disolventes. Otra biblioteca de péptidos derivados químicamente usa la fotolitografía para detectar péptidos inmovilizados sobre portaobjetos de cristal. En lo sucesivo en el presente documento, éstos y los procedimientos relacionados se denominan de manera conjunta "detección selectiva de péptidos químicos". La detección selectiva de péptidos químicos puede ser ventajosa en cuanto a que permite el uso de D-aminoácidos y otros análogos no naturales, así como de elelemtnos no peptídicos. Tanto los procedimientos químicos como químicos se revisan en Wells y Lowman, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 3: 355-62 (1992).

Conceptualmente, se pueden descubrir miméticos peptídicos de cualquier proteína usando expresión en fagos y los demás procedimientos mencionados anteriormente. Estos procedimientos se han usado para el mapeo de epítopos, para identificación de aminoácidos cruciales en las interacciones proteína-proteína y como guías para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Véase, por ejemplo, Cortese y col., Curr. Opin. Biotech. 7: 616-21 (1996). Actualmente se están usando bibliotecas de péptidos, muy a menudo en estudios inmunológicos, tales como el maepo de epítopos. Vease, Kreeger, The Scientist 10(13):19-20(1996).

Los péptidos identificados mediante detección selectiva de bibliotecas de expresión en fagos se han considerado "guías" en el desarrollo de agentes terapéuticos en lugar de cómo los propios agentes terapéuticos. Como otras proteínas y péptidos, probablemente se eliminan rápidamente *in vivo* mediante la filtración renal, por mecanismos de aclaramiento celular en el sistema reticuloendotelial o mediante degradación proteolítica [Francis, (anteriormente)]. Como resultado, actualmente la técnica usa péptidos para validar las dianas farmacológicas o como armazones para diseñar compuestos orgánicos que podrían no haberse identificado tan fácilmente o tan rápidamente mediante detección selectiva de bibliotecas químicas [Lowman, (anteriormente); Kay et al., (anteriormente)]. La técnica se beneficiaría de un procedimiento por el cual dichos péptidos podrían dar con mayor facilidad agentes terapéuticos contra la angiogénesis.

Estructura de los pepticuerpos

En las composiciones de la materia preparadas de acuerdo con la presente invención, el péptido puede estar unido a un vehículo a través del extremo N o el extremo C. Por tanto, las moléculas vehículo-péptido de la presente invención se pueden describir mediante las siguientes cinco fórmulas y multímeros de las mismas:

(X ₁) _a -F ₁ -(X ₂) _b	(FÓRMULA I)
X ₁ -F ₁	(FÓRMULA II)
F ₁ -X ₂	(FÓRMULA III)
F ₁ -(L ₁) _c -P ₁	(FÓRMULA IV)
F ₁ -(L ₁) _c -P ₁ -Cl ₂) _d -P ₂	(FÓRMULA V)

en la que:

F₁ un vehículo (preferentemente un dominio Fc);

X₁ y X₂ se seleccionan, cada uno de forma independiente, de-(L₁)_c-P₁, -(L₁)_c-P₁-(L₂)_d-P₂, -(L₁)_c-P₁-(L₂)_d-P₂-(L₃)_e-P₃, y -(L₁)_c-P₁-(L₂)_d-P₂-(L₃)_e-P₃-(L₄)_f-P₄

P₁, P₂, P₃ y P₄ son, cada uno de forma independiente, secuencias de péptidos farmacológicamente activos descritos en el presente documento;

L₁, L₂, L₃, y L₄ son, cada uno de forma independiente, enlazadores;

"a", "b", "c", "d", "e" y "f" son, cada uno de forma independiente, 0 o 1, siempre que al menos uno de "a" y "b" es 1.

Péptidos

La presente invención contempla péptidos que se unen de forma selectiva o que se unen específicamente a Ang-2. Se puede usar cualquier número de dichos péptidos junto con la presente invención. En particular, la expresión en fagos es útil en la generación de péptidos para usar en la presente invención, ya que se ha demostrado que la selección por afinidad en bibliotecas de péptidos aleatorios se puede usar para identificar los ligandos peptídicos para cualquier sitio de cualquier producto génico. Dedman y col., J. Biol. Chem. 268: 23025-30 (1993).

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos divulgados en la técnica. Para los aminoácidos se usan abreviaturas de una sola letra. La "X" en cualquier secuencia (y a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario en un caso concreto, significa que puede estar presente cualquiera de los 20 residuos aminoácidos naturales, o cualquier aminoácido de origen no natural (descritos más adelante como "Variantes"). Cualquier de estos péptidos se pueden unir en tandem (es decir, secuencialmente), con o sin enlazadores, y en la tabla se proporcionan ejemplos de unión en tandem. Los enlazadores se indican en la lista como "E" y pueden ser cualquiera de los enlazadores que se indican en el presente documento. Las repeticiones y enlazadores en tandem se muestran separados por barras a efectos de claridad. Cualquier péptido que contenga un residuo cisteínilo puede estar reticulado con otro péptido que contenga Cys, cualquier o ambos pueden estar unidos a un vehículo. Asimismo, cualquier péptido que tenga más de un residuo Cys puede formar un enlace disulfuro intrapeptídico. Cualquier de estos péptidos se puede derivatizar como se describe en el presente documento. Para los derivados en los que el extremo carboxilo puede estar tapado con un grupo amino, el grupo amino de tapado es -NH₂. Para los derivados en los que los residuos aminoácidos

están sustituidos por restos que no son residuos aminoácidos, las sustituciones se indican con una S, que significa cualquiera de los restos descritos en Bhatnagar y col. *Med Chem.* 39: 3814-9 (1996), y Cuthbertson y col., *J. Med. Chem.* 40: 2876-82, 1997), que se incorporan por referencia. Todos los péptidos están unidos mediante enlaces peptídicos, a menos que se indique lo contrario.

5 **Vehículos**

En una realización, la presente invención proporciona al menos un péptido para unirse a al menos un vehículo (F_1 , F_2) a través del extremo N, el extremo C o una cadena lateral de uno de los residuos aminoácidos del(los) péptido(s). También se pueden usar múltiples vehículos, por ejemplo Fc en cada extremo o un Fc en un extremo y un grupo PEG en el otro extremo o una cadena lateral.

10 Un dominio Fc es un vehículo preferido. El dominio Fc puede estar condensado al extremo N o C de los péptidos o en ambos extremos N y C.

Como se ha indicado anteriormente, las variantes de Fc son vehículos adecuados dentro del alcance de la presente invención. Un Fc nativo puede estar ampliamente modificado para formar una variante de Fc de acuerdo con la presente invención, siempre que se mantenga la unión al receptor de rescate. Véase, por ejemplo, los documentos 15 WO 97/34631 y WO 96/32478. En dichas variantes de Fc, se pueden eliminar uno o más sitios de un Fc nativo que proporcione características estructurales o actividad funcional no requerida por las moléculas de fusión de la presente invención. Estos sitios se pueden eliminar, por ejemplo, sustituyendo o delecionando residuos, insertando residuos en el sitio o truncando porciones que contienen el sitio. Los residuos insertados o sustituidos pueden 20 también ser aminoácidos alterados, tales como peptidomiméticos o D-aminoácidos. Las variantes de Fc pueden ser deseables por una serie de razones, varias de las cuales se describen a continuación. Ejemplos de variantes de Fc incluyen las moléculas y las secuencias en las que:

25 1. Se eliminan los sitios implicados en la formación de enlaces disulfuro. Dicha eliminación puede evitar la reacción con otras proteínas que contienen cisteína presentes en la célula huésped usada para producir las moléculas de la invención. Para este fin, el segmento que contiene cisteína en el extremo N puede estar truncado o los residuos de cisteína se pueden delecionar o sustituir con otros aminoácidos (p. ej., alanilo, serilo). Incluso cuando los residuos de cisteína se eliminan, los dominios de Fc de una cadena pueden seguir formando un dominio Fc dimérico que se mantiene unido de forma no covalente.

30 2. Un Fc nativo se modifica para hacerlo más compatible con una célula huésped seleccionada. Por ejemplo, se puede eliminar la secuencia PA cerca del extremo N de un Fc nativo típico, que puede ser reconocido por una enzima digestiva en *E. coli*, tal como la prolina iminopeptidasa. También se puede añadir un residuo metionilo en N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de forma recombinante en una célula bacteriana, como *E. coli*.

35 3. Una porción del extremo N de un Fc nativo se elimina para prevenir la heterogeneidad en N-terminal cuando se expresa en una célula huésped determinada. Para este fin, se puede delecionar cualquiera de los primeros 20 residuos aminoácidos en el extremo N, en particular los de las posiciones 1, 2, 3, 4 y 5.

40 4. Se eliminan uno o más sitios de glicosilación. Los residuos que normalmente están glicosilados (p. ej., asparagina) pueden conferir respuesta citolítica. Dichos residuos pueden estar delecionados o sustituidos con residuos no glicosilados (p. ej., alanina).

45 5. Se eliminan los sitios implicados en la interacción con el complemento, tal como el sitio de unión C1q. Por ejemplo, se puede delecionar o sustituir la secuencia EKK de la IgG1 humana. El reclutamiento del complemento puede no ser ventajoso para las moléculas de la presente invención y, por tanto, pueden evitarse con dicha variante de Fc.

50 6. Se eliminan los sitios que afectan a la unión a los receptores de Fc aparte de un receptor de rescate. Un Fc nativo puede tener sitios para la interacción con ciertas glóbulos blancos que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención y de ese modo pueden eliminarse.

7. Se elimina el sitio ADCC. En la técnica se conocen sitios ADCC. Véase, por ejemplo, *Molec Immunol* 29 (5):633-9 (1992) con respecto a sitios ADCC en IgG1. Estos sitios tampoco se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención y de ese modo pueden eliminarse.

55 8. Cuando el Fc nativo deriva de un anticuerpo no humano, puede humanizarse el Fc nativo. Normalmente, para humanizar un Fc nativo, se sustituirán residuos seleccionados en el Fc nativo no humano por residuos que se encuentran normalmente en Fc nativo humano. Se conocen bien en la materia técnica para la humanización de anticuerpos.

Un vehículo alternativo sería una proteína, polipéptido, péptido, fragmento de anticuerpo o molécula pequeña (por ejemplo, un compuesto peptidomimético) capaz de unirse a un receptor de rescate. Por ejemplo, podría usarse como vehículo un polipéptido tal como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.739.277, presentada el 14 de abril

de 1998 concedida a Presta y col. También podrían seleccionarse péptidos mediante presentación en fagos para la unión al receptor de rescate FcRn. Tales compuestos de unión al receptor de rescate también se incluyen dentro del significado de "vehículo" y se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Tales vehículos deben seleccionarse de modo que tengan un aumento de la semivida (por ejemplo, evitando secuencias reconocidas por proteasas) y una reducción de la inmunogenicidad (por ejemplo, favoreciendo secuencias no inmunogénicas, tal como se determinan en la humanización de anticuerpos).

Como se ha indicado anteriormente, también se pueden usar vehículos poliméricos para F₁ y F₂. Actualmente se dispone de diversos medios para la unión de restos químicos útiles como vehículos, véase, por ejemplo, la publicación internacional del tratado de cooperación en materia de patentes ("PCT") n.º WO 96/11953, con título "N-Temnally Chemically Modified Protein Compositions and Methods". Esta publicación PCT da a conocer, entre otras cosas, la unión selectiva de polímeros hidrosolubles al extremo N terminal de proteínas.

Un vehículo polimérico preferido es polietilenglicol (PEG). El grupo PEG puede ser de cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular promedio del PEG oscilará, preferentemente, entre aproximadamente 2 kiloDalton ("kDa") y aproximadamente 100 kDa, más preferentemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, lo más preferentemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 10 kDa. Los grupos PEG se unirán, generalmente, a los compuestos de la invención por medio de acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo en el resto PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, tiol o éster) para dar un grupo reactivo en el compuesto de la invención (por ejemplo, un grupo aldehído, amino o éster).

Una estrategia útil para la PEGilación de péptidos sintéticos consiste en combinar, a través de la formación de un enlace conjugado en disolución, un péptido y un resto PEG, teniendo cada uno una funcionalidad especial que es mutuamente reactiva una hacia la otra. Los péptidos pueden prepararse fácilmente con síntesis en fase sólida convencionales tal como se conocen en la técnica. Los péptidos se "activan previamente" con un grupo funcional apropiado en un sitio específico. Los precursores se purifican y se caracterizan completamente antes de que reaccionen con el resto PEG. El enlace del péptido con PEG tiene lugar usualmente en fase acuosa y puede supervisarse fácilmente mediante HPLC analítica en fase inversa. Los péptidos PEGilados pueden purificarse fácilmente mediante HPLC preparativa y caracterizarse mediante HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas mediante desorción por láser.

Los polímeros de polisacárido son otro tipo de polímero hidrosoluble que pueden usarse para la modificación de proteínas. Los dextranos son polímeros de polisacárido compuestos por subunidades individuales de glucosa unidas principalmente mediante enlaces 1-6. El propio dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular y está disponible fácilmente en pesos moleculares desde aproximadamente 1 kDa hasta aproximadamente 70 kDa. El dextrano es un polímero hidrosoluble adecuado para su uso en la presente invención como vehículo por sí mismo o en combinación con otro vehículo (por ejemplo, Fc). Véase, por ejemplo, el documento WO 96/11953 y el documento WO 96/05309. Se ha notificado el uso de dextrano conjugado a inmunoglobulinas terapéuticas o de diagnóstico; véase, por ejemplo, la publicación de patente europea n.º 0 315 456, que se incorpora en el presente documento por referencia. Se prefiere dextrano de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 20 kDa cuando se usa dextrano como vehículo según la presente invención.

Enlazadores

Cualquier grupo "enlazador" es opcional. Cuando está presente, su estructura química no es crucial, ya que sirve principalmente como espaciador. El enlazador está constituido, preferentemente, por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Por tanto, en realizaciones preferidas, el enlazador está formado por de 1 hasta 20 aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos se seleccionan de los 20 aminoácidos que se producen de manera natural. Uno o más de estos aminoácidos pueden glicosilarse, tal como entienden los expertos en la técnica. En una realización más preferida, los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. Incluso más preferentemente, un enlazador está constituido por una mayor parte de aminoácidos que están estéricamente impedidos, tales como glicina y alanina. Por tanto, enlazadores preferidos son poliglicinas (particularmente (Gly)₅, (Gly)₈), poli(Gly-Ala), y polialaninas. Las combinaciones de Gly y Ala también son preferidas, y es el enlazador denominado en el presente documento K1 y teniendo una secuencia de aminoácidos que se expone en los Ejemplos del presente documento.

También son posibles los enlazadores no peptídicos. Por ejemplo, pueden usarse enlazadores alquílicos tales como -NH-(CH₂)_s-C(O)-, en el que s = 2-20. Estos enlazadores alquílicos pueden sustituirse además por cualquier grupo de no impedimento estérico, tal como alquilo inferior (por ejemplo, C₁-C₆), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH₂, fenilo, etc. Un enlazador no peptídico a modo de ejemplo es un enlazador de PEG, y tiene un peso molecular de 100 kDa a 5000 kDa, preferentemente de 100 kDa a 500 kDa. Los enlazadores peptídicos pueden modificarse para formar derivados de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Variantes y derivados

Las variantes y derivados de los agentes de unión específica se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Dentro de las variantes se incluyen variantes de inserción, de delección y de sustitución. Se entiende que un agente de unión específica de la presente invención puede contener uno, dos a los tres tipos de variantes. Las

variantes de inserción y de sustitución puede contener aminoácidos naturales, aminoácidos no convencionales (como se expone más adelante) o ambas.

En un ejemplo, se proporcionan variantes de inserción en las que uno o más residuos de aminoácidos, aminoácidos o bien que se producen de manera natural o no convencionales, se añaden a una secuencia de aminoácidos peptídicos o de pepticuerpos. Las inserciones se puede localizar en uno cualquiera o en ambos extremos de la proteína o pueden encontrarse dentro de las regiones internas de la secuencia de aminoácidos del pepticuerpo. Las variantes de inserción con residuos adicionales en uno cualquiera o en ambos extremos pueden incluir, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcadores o etiquetas de aminoácidos. Las variantes de inserción incluyen péptidos y pepticuerpos en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden a la secuencia de aminoácidos del péptido o el pepticuerpo, o fragmento del mismo.

Los productos variantes de la invención también incluyen péptidos y pepticuerpos maduros en los que se eliminan las secuencias líder o señal, y las proteínas resultantes que tienen residuos amino terminales adicionales, cuyos aminoácidos pueden ser naturales o no naturales. Se contemplan agentes de unión específica (tales como pepticuerpos) con un residuo de metionilo adicional en la posición de aminoácido -1 (Met-1-pepticuerpo), ya que son agentes de unión específica con residuos de metionina y lisina adicionales en las posiciones -2 y -1 (Met-2-Lys-1). Las variantes que tienen residuos Met, Met-Lys, Lys adicionales (o uno o más residuos básicos, en general) son particularmente útiles para una producción de proteínas recombinantes potenciada en células huéspedes bacterianas.

La invención también abarca variantes de agentes d eunión que tienen residuos de aminoácidos adicionales que surgen del uso de sistemas de expresión específicos. Por ejemplo, el uso de vectores comercialmente disponibles que expresan un polipéptido deseado como parte del producto de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) proporciona el polipéptido deseado que tiene un residuo de glicina adicional en la posición de aminoácido -1 tras la escisión del componente GST del polipéptido deseado. También se contemplan variantes que resultan de la expresión en otros sistemas de vector, incluyendo aquéllas en las que se incorporan etiquetas de histidina en la secuencia de aminoácidos, generalmente en el extremo carboxilo terminal y/o amino de la secuencia.

Las variantes de inserción también incluyen proteínas de fusión en las que los extremos amino y/o carboxilo del péptido o pepticuerpo se fusionan con otro polipéptido, un fragmento del mismo o aminoácidos que no se reconocen generalmente que son parte de cualquier secuencia de proteínas específica. Ejemplos de tales proteínas de fusión son polipéptidos inmunógenos, proteínas con semivididas en circulación prolongadas, tales como regiones constantes de inmunoglobulinas, proteínas marcadoras, proteínas o polipéptidos que facilitan la purificación del péptido o pepticuerpo deseado y secuencias de polipéptidos que estimulan la formación de proteínas multiméricas (tales como motivos en cremallera de leucina que son útiles en la formación/estabilidad de dímeros).

Este tipo de variante de inserción tiene, generalmente, toda o una parte sustancial de la molécula nativa, unida en el extremo N o C, a toda o una parte de un segundo polipéptido. Por ejemplo, las proteínas de fusión emplean normalmente secuencias líder de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un huésped heterólogo. Otra proteína de fusión útil incluye la adición de un dominio inmunológicamente activo, tal como un epítopo de anticuerpo, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. La inclusión de un sitio de escisión en o próximo a la unión de fusión facilitará la eliminación del polipéptido extraño tras la purificación. Otras fusiones útiles incluyen enlaces de dominios funcionales, tales como sitios activos de enzimas, dominios de glicosilación, señales dirigidas celulares o regiones transmembrana.

Existen diversos sistemas de expresión de proteínas de fusión comercialmente disponibles que pueden usarse en la presente invención. Sistemas particularmente útiles incluyen, entre otros, el sistema glutatión-S-transferasa (GST) (Pharmacia), el sistema de la proteína de unión a maltosa (NEB, Beverley, MA), el sistema FLAG (IBI, New Haven, CT) y el sistema 6xHis (Qiagen, Chatsworth, CA). Estos sistemas pueden producir péptidos y/o pepticuerpos recombinantes que portan sólo un número pequeño de aminoácidos adicionales, que no es probable que afecten significativamente a la actividad del péptido o pepticuerpo. Por ejemplo, tanto el sistema FLAG como el sistema 6xHis añaden sólo secuencias cortas, que se conocen ambas que son poco antigenicas y que no afectan de manera adversa al plegamiento de un polipéptido con respecto a su conformación nativa. Otra fusión N terminal que se considera que es útil es la fusión de un dipéptido de Met-Lys en la región N terminal de la proteína o los péptidos. Dicha fusión puede producir aumentos beneficiosos de la actividad o expresión proteica.

Otros sistemas de fusión producen híbridos polipeptídicos en los que es deseable escindir la pareja de fusión del péptido o pepticuerpo deseado. En una realización, la pareja de fusión está unida al pepticuerpo recombinante mediante una secuencia peptídica que contiene una secuencia de reconocimiento específico para una proteasa. Ejemplos de secuencias adecuadas son las reconocidas por la proteasa del virus del grabado de tabaco (Life Technologies, Gaithersburg, MD) o el Factor Xa (New England Biolabs, Beverley, MA).

La invención también proporciona polipéptidos de fusión que comprenden todo o parte de un péptido o pepticuerpo de la presente invención, en combinación con el factor tisular truncado (tTF). El tTF es un agente dirigido vascular que consiste en una forma truncada de una proteína inductora de la coagulación humana que actúa como agente de coagulación de vasos sanguíneos tumorales, tal como se describe en las patentes de EE.UU. Nº: 5.877.289; 6.004.555; 6.132.729; 6.132.730; 6.156.321; y la patente europea nº EP 0988056.

La fusión de tTF al pepticuerpo o péptido anti-Ang-2, o fragmentos de los mismos, facilita la liberación de anti-Ang.2 en las células diana.

5 Las variantes de sustitución incluyen los péptidos y pepticuerpos en los que se eliminan uno o más residuos de aminoácidos y son sustituidos por uno o más aminoácidos alternativos, que pueden ser aminoácidos naturales o no naturales. Las variantes de sustitución generan péptidos y pepticuerpos que son "similares" al péptido y pepticuerpo original en cuanto a que las dos moléculas tienen un cierto porcentaje de aminoácidos que son idénticos. Las variantes de sustitución incluyen sustituciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 aminoácidos dentro de un péptido o pepticuerpo, en las que el número de sustituciones puede ser de hasta un diez por cieno o más de los aminoácidos del péptido o pepticuerpo. Las sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora, no obstante, la invención abarca sustituciones que son también no conservadoras y también incluye aminoácidos no convencionales.

10 15 La identidad y similitud de los péptidos y pepticuerpos se pueden calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Tales procedimientos incluyen, entre otros, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. ed., Oxford University Press, New York, (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

20 25 Los procedimientos para determinar la relación o la identidad en porcentaje de dos péptidos o polipéptidos, o un polipéptido y un péptido, se diseñan para proporcionar el mayor apareamiento entre las secuencias sometidas a ensayo. Además, los procedimientos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles para el público. Los procedimientos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, entre otros, el paquete del programa GCG, incluido GAP (Devereux, J., y col., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul y col., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y col., NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul y col., anteriormente (1990)). También se puede usar el algoritmo bien conocido de SmithWaterman para determinar la identidad.

30 35 Ciertos esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el apareamiento de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta región alineada pequeña puede tener una identidad de secuencia muy alta incluso si no existe una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. De acuerdo con esto, en ciertas realizaciones, el procedimiento de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos el diez por ciento de la longitud completa del polipéptido diana que está comparándose, es decir, al menos 40 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de al menos 400 aminoácidos, 30 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de al menos 300 a aproximadamente 400 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de 200 a aproximadamente 300 aminoácidos, y al menos 10 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de aproximadamente 100 a 200 aminoácidos.

40 45 55 Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos para los que va a determinarse el porcentaje de identidad de secuencia se alinean para obtener el apareamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos (el "tramo apareado", tal como se determina mediante el algoritmo). En ciertas realizaciones, una sanción por apertura de huecos (que se calcula normalmente como 3X la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que está usándose; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada aminoácido perfecto apareado mediante la matriz de comparación concreta) y una sanción por extensión de huecos (que es normalmente 1/10 veces la sanción de apertura de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se usan junto con el algoritmo. El algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véase Dayhoff y col., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3)(1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:1091510919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).

50 Los parámetros para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y col., J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970);

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff y col., anteriormente (1992);

Sanción por hueco: 12

Sanción de longitud de hueco: 4

55 Umbral de similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En ciertas realizaciones, los parámetros mencionados

anteriormente son los parámetros predeterminados para comparaciones de polipéptidos (junto con ausencia de sanción por huecos finales) usando el algoritmo GAP.

Los parámetros para secuencias de moléculas de polinucleótidos (a diferencia de una secuencia de aminoácidos) incluyen los siguientes:

- 5 Algoritmo: Needleman y col., anteriormente (1970);
 Matriz de comparación: apareamientos = + 10, apareamiento erróneo = 0
 Sanción por hueco: 50
 Sanción de longitud de hueco: 3
- 10 El programa GAP también puede ser útil con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones de moléculas de polinucleótidos.
- 15 Pueden usarse otros ejemplos de algoritmos, sanciones de apertura de huecos, sanciones de extensión de huecos, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc., incluidos los expuestos en el Manual de Programas, Paquete de Wisconsin, Versión 9, septiembre de 1997. Las selecciones concretas que van a realizarse serán evidentes para los expertos en la técnica y dependerán de la comparación específica que va a realizarse, tal como ADN a ADN, proteína a proteína, proteína a ADN; y adicionalmente, si la comparación es entre pares de secuencias dados (en cuyo caso se prefieren generalmente GAP o BestFit) o entre una secuencia y una base de datos grande de secuencias (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).
- 20 Como se usa en la presente memoria descriptiva, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2^a Edición, E.S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que se incorpora en el presente documento por referencia para cualquier fin.
- 25 Los aminoácidos pueden tener estereoquímica L o D (a excepción de Gly, que no es ni L ni D) y los polipéptidos y composiciones de la presente invención pueden comprender una combinación de estereoquímicas. Sin embargo, se prefiere la estereoquímica L. La invención también proporciona moléculas inversas en las que la secuencia desde amino terminal a carboxi terminal de los aminoácidos está invertida. Por ejemplo, la inversa de una molécula que tiene la secuencia normal X₁-X₂-X₃ sería X₃-X₂-X₁. La invención también proporciona moléculas retro-inversas, en las que, como antes, la secuencia desde amino terminal a carboxi terminal de los aminoácidos está invertida y los residuos que normalmente son enantiómeros "L" están alterados en su forma estereoisómero "D".
- 30 Los estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α -, α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen, sin limitaciones: ácido aminoacético, beta-alanina, beta-aminopropiónico, ácido aminobutírico, ácido piperidínico, ácido aminocapriónico, ácido aminoheptanoico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, N-etylglicina, N-etylparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilsoleucina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, oritina, 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fososerina, N-acetilserrina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos similares y aminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina).
- 40 De forma similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos monocatenarias es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarias se denomina la dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de los tránscritos de ARN naciente se denomina la dirección de transcripción; las regiones de la secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ADN y son 5' al extremo 5' del tránsrito de ARN se denominan "secuencias corriente arriba"; las regiones de la secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 3' al extremo 3' del tránsrito de ARN se denominan "secuencias corriente abajo".
- 45 Se apreciará que los residuos de aminoácidos pueden dividirse en clases basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

- 50 1. Hidrófobos neutros: Alanina (Ala; A), Valina (Val; V), Leucina (Leu; L), Isoleucina (Ile; I), Prolinina (Pro; P), Triptófano (Trp; W), Fenilalanina (Phe; F) y Metionina (Met, M).
2. Polares neutros: Glicina (Gly; G); Serina (Ser; S), Treonina (Thr; T), Tirosina (Tyr; Y), Cisteína (Cys; C), Glutamina (Glu; Q), Asparagina (Asn; N), y Norleucina.
3. Ácidos: Ácido aspártico (Asp; D), ácido glutámico (Glu; E);

4) Básicos: Lisina (Lys; K), Arginina (Arg; R), Histidina (His; H).

Véase Lewin, B., Genes V, Oxford University Press (1994), p.11.

Las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden abarcar residuos de aminoácidos no convencionales, que normalmente se incorporan mediante síntesis peptídica química en lugar de síntesis en sistemas biológicos. Estas incluyen, sin limitaciones, peptidomiméticos y otras formas reversas o invertidas de restos aminoácidos. Las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase.

Al realizar dichas sustituciones, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga. Éstos son: 5 isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

10 Generalmente, en la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos a la hora de conferir la función biológica interactiva sobre una proteína (Kyte y col., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982)). Se sabe 15 que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y siguen conservando una actividad biológica similar. Al realizar cambios en base al índice hidropático, se puede incluir la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están en ± 2 . Se pueden incluir los que están en ± 1 y se pueden incluir los que están en $\pm 0,5$.

20 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar de forma eficaz sobre la base de la hidrofilicidad, particularmente cuando el peptidujo o péptido biológicamente funcional creado de este modo está destinado al uso en realizaciones inmunológicas, como en este caso. En ciertas realizaciones, la hidrofilicidad promedio local mayor de un a proteína está dirigida por la hidrofilicidad de sus aminoácidos adyacentes, 25 se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir con una propiedad biológica de la proteína.

25 A estos residuos de aminoácidos se les ha asignado los siguientes valores de hidrofilicidad: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al realizar cambios en base a una hidrofilicidad similar, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilicidad pueden estar ± 2 , se incluyen los que pueden estar ± 1 y se pueden incluir los que están $\pm 0,5$. También se pueden identificar epítopos 30 de secuencias de aminoácidos primarias sobre la base de la hidrofilicidad. Estas regiones también se denominan "regiones centrales epitópicas".

Ejemplos de sustituciones de aminoácidos se exponen en la Tabla 2 siguiente:

Tabla 2

	Sustituciones de aminoácidos	
Residuos originales	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, Glu, Asp	Gln
Asp	Glu, Gln, Asp	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn, Glu, Asp	Asn
Glu	Asp, Gln, Asn	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly

Sustituciones de aminoácidos		
Residuos originales	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido, tal como se expone en el presente documento, usando técnicas bien conocidas. Un experto en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la molécula que se pueden cambiar sin destruir la actividad dirigiendo a regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. Se pueden identificar residuos o porciones de las moléculas que están conservados entre péptidos o polipéptidos similares. Incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a sustituciones conservadoras de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar de forma adversa a la estructura del polipéptido.

5 Un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función identificando residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de esta comparación, se puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a los residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos residuos de aminoácidos importantes predichos.

10 Adicionalmente, un experto en la técnica puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con dicha estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, los expertos en la técnica pueden predecir la alineación de restos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura de tres dimensiones. El experto en la técnica pueden elegir no realizar cambios radicales en los residuos de aminoácidos predichos que están sobre la superficie de la proteína, ya que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes

15 con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de ensayo que contienen una sola sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes después se pueden seleccionar usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes se pueden usar para acumular información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular dio como resultado la destrucción, reducción de manera no deseada, o no adecuada, de la actividad, las variantes con tal cambio se pueden evitar. En otras palabras, basándose en la información acumulada a partir de tales experimentos de rutina, el experto en la técnica puede fácilmente determinar los aminoácidos en los que se deben evitar las sustituciones, bien solas o en combinación con otras mutaciones.

20 Se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou y col., Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chou y col., Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); Chou y col., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou y col., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 y Chou y col., Biophys. J., 26:367-384 (1979). Además, actualmente se dispone programas de ordenador para ayudar a la predicción de la estructura secundaria. Un procedimiento de predicción de la estructura secundaria se basa en la modelación de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia de más de 30%, o similitud mayor que 40% a menudo tienen 25 topologías estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructural de la proteína (PDB) ha proporcionado una capacidad de protección potenciada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de plegamientos dentro de una estructura de los polipéptidos o proteínas. Véase Holm y col., Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner y col., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3): 369 - 376 (1997)) que existe un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dados y que una vez que se ha resuelto un número 30 crítico de estructuras, la predicción estructural llegará a ser notablemente más precisa.

35 Procedimientos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen el "enhebrado" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl y col., Structure, 4(1):15-19 (1996)), "análisis del perfil" (Bowie y col., Science, 253:164-170 (1991); Grabskov y col., Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Grabskov y col., Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358 (1987)), y "enlace de evolución" (Véase Holm, ant. (1999), y Brenner, ant. (1997)).

40 En ciertas realizaciones, las variantes de peptícuero incluyen variantes de glicosilación en las que uno o más de 45 sitios de glicosilación, tales como un sitio de glicosilación unido a N, se ha añadido al peptícuero. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución o adición de residuos de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona un posible sitio nuevo para la adición de una cadena de hidrato de carbono unida a N. Como alternativa, las sustituciones que eliminan esta secuencia retirarán una cadena 50 de hidrato de carbono unida a N existente. También se proporciona una reorganización de cadenas de hidratos de

carbono unidas a N, en las que se eliminan uno o más sitios de glicosilación unidos N (normalmente aquéllos que se producen de manera natural) y se crean uno o más sitios unidos a N nuevos.

La invención también proporciona "derivados", que incluyen pepticuerpos portadores de modificaciones diferentes de, o además de, inserciones, delecciones o sustituciones de residuos de aminoácidos. Preferentemente, las modificaciones son de naturaleza covalentes e incluyen, por ejemplo, la unión química con polímeros, lípidos, diferentes de restos orgánicos e inorgánicos. Los derivados de la invención se pueden preparar para aumentar la semivida de circulación de un pepticuerpo, o se pueden diseñar para mejorar la capacidad de dirección para el pepticuerpo a las células, tejidos u órganos deseados.

Los derivados ejemplares incluyen restos en los que se han realizado una o más de las siguientes modificaciones:

- 10 • Uno o más de los enlaces peptídico [-C(O)NR-] (enlaces) se han reemplazado por un enlace no peptídico tal como un enlace -CH₂-carbamato [-CH₂-OC(O)NR-]; un enlace fosfonato; un enlace -CH₂-sulfonamida [-CH₂-S(O)NR-]; un enlace urea [-NHC(O)NH-]; un enlace -CH₂-amina secundaria; o un enlace peptídico alquilado [-C(O)NR⁶- donde R⁶ es alquilo inferior];
- 15 • Péptidos en los que el extremo N se derivatiza a un grupo -NRR¹; a un grupo -NRC(O)R; a un grupo -NRC(O)OR; a un grupo -NRS(O)₂R; a un grupo -NHC(O)NHR, donde R y R¹ son hidrógeno o alquilo inferior, con la condición de que R y R¹ no sean ambos hidrógeno; a un grupo succinimida; a un grupo benciloxicarbonil-NH-(CBZ-NH-); o a un grupo benciloxicarbonil-NH- que tiene entre 1 y 3 sustituyentes sobre el anillo fenilo seleccionado entre el grupo constituido por alquilo inferior, alcoxi inferior, cloro, y bromo; y
- 20 • Péptidos en los que el extremo C libre se derivativa a --C(O)R² donde R² se selecciona entre el grupo constituido por alcoxi inferior y- NR³R⁴ donde R³ y R⁴ se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por hidrógeno y alquilo inferior. Por "inferior" se quiere decir un grupo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

De manera adicional, se pueden introducir modificaciones de aminoácidos individuales en los polipéptidos o composiciones de la invención haciendo reaccionar los residuos de aminoácidos dirigidos del péptido con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. Los siguientes son ejemplos:

Pueden hacerse reaccionar residuos de lisinilo y residuos amino terminales con anhídridos de ácido succínico u otro ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pantanodiona; y la reacción con glioxitato catalizada por transaminasa.

Los residuos de arginilo pueden modificarse mediante la reacción con uno cualquiera o combinación de varios reactivos convencionales, incluyendo fenilgioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la alta pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo guanidino de arginina.

Se ha estudiado extensamente la modificación específica de residuos de tirosilo, con particular interés en la introducción de etiquetas espectrales en residuos de tirosilo mediante la reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más habitualmente se pueden usar N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies O-acetyl-tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.

Los grupos carboxilo de cadena lateral (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse de forma selectiva mediante la reacción con carbodiimidas (R'-N=C=N-R') tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo pueden convertirse en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

Los residuos de glutaminilo y asparaginilo con frecuencia se desmidan para dar los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo. Como alternativa, estos residuos se pueden desamidar en condiciones ácidas suaves. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular los péptidos o sus derivados funcionales a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros vehículos macromoleculares. Los agentes de reticulación de uso habitual incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato proporcionan compuestos intermedios fotoactivables que pueden formar reticulaciones en presencia de luz. Como alternativa, se pueden emplear matrices insolubles en agua reactivas, tales como hidratos de carbono activados por bromuro de cianógeno

y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE.UU. nº 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 para la inmovilización de proteínas.

Otras modificaciones posibles incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o tetroxilo, oxidación del átomo de azufre en Cys, metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina (Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de la amina del extremo N, y, en algunos casos, amidación de los grupos carboxilo C-terminal.

Tales restos derivatizados preferentemente mejoran una o más características, incluyendo la actividad antiangiogénica, solubilidad, absorción, semivida biológica, y similares, de los compuestos. Como alternativa, los restos derivatizados pueden dar como resultado compuestos que tienen las mismas, o esencialmente las mismas, características y/o propiedades del compuesto que no está derivatizado. Los restos pueden, como alternativa, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable del compuesto y similares.

Los compuestos de la presente invención se pueden cambiar a nivel de ADN también. La secuencia de ADN de cualquier parte del compuesto puede estar cambiada a codones más compatibles con la célula huésped elegida. Para *E. coli*, que es la célula huésped preferida, se conocen en la técnica codones optimizados. Los codones pueden estar sustituidos para eliminar sitios de restricción o para incluir sitios de restricción silenciosos, que pueden ayudar al procesamiento del ADN en la célula huésped seleccionada. Las secuencias del vehículo, el enlazador y el ADN peptídico se pueden modificar para que incluyan cualquiera de los anteriores cambios en la secuencia. Por tanto, todas las modificaciones, sustituciones, derivatizaciones, etc. descritas en el presente documento se aplican igualmente a todos los aspectos de la presente invención, incluyendo, entre otros, péptidos, dímeros y multímeros de péptido, enlazadores y vehículos.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función identificando residuos en péptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de esta comparación, se puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en un péptido que corresponden a los residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o la estructura en péptidos similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos residuos de aminoácidos importantes predichos de los péptidos.

El experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con dicha estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, los expertos en la técnica pueden predecir la alineación de restos de aminoácidos de un péptido con respecto a su estructura de tres dimensiones. El experto en la técnica pueden elegir no realizar cambios radicales en los residuos de aminoácidos predichos que están sobre la superficie de la proteína, ya que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de ensayo que contienen una sola sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes después se pueden seleccionar usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales datos se pueden usar para acumular información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular dio como resultado la destrucción, reducción de manera no deseada, o no adecuada, de la actividad, las variantes con tal cambio se podrían evitar. En otras palabras, basándose en la información acumulada a partir de tales experimentos de rutina, el experto en la técnica puede fácilmente determinar los aminoácidos en los que se deben evitar las sustituciones, bien solas o en combinación con otras mutaciones.

Se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moult J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4): 422-427 (1996), Chou y col., *Biochemistry*, 13(2): 222-245 (1974), Chou y col., *Biochemistry*, 113(2): 211-222 (1974); Chou y col., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978), Chou y col., *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276 y Chou y col., *Biophys. J.*, 26: 367-384 (1979). Además, actualmente se dispone programas de ordenador para ayudar a la predicción de la estructura secundaria. Un procedimiento de predicción de la estructura secundaria se basa en la modelación de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia de más de 30%, o similitud mayor que 40% a menudo tienen topologías estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructural de la proteína (PDB) ha proporcionado una capacidad de protección potenciada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de plegamientos dentro de una estructura de los polipéptidos o proteínas. Véase Holm y col., *Nucl. Acid. Res.*, 27(1): 244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner y col., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3) 369-376 (1997): que existe un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dados y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural llegará a ser notablemente más precisa.

Procedimientos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen el "enhebrado" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3):377-87 (1997); Sippl y col., *Structure*, 4(1):15-9 (1996)), "análisis del perfil" (Bowie y col., *Science*, 253: 164-170 (1991); Gribskov et al., *Meth. Enzym.*, 183: 146-159 (1990); Gribskov y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13): 4355-8 (1987)), y "enlace en evolución" (Véase Home, ant., y Brenner, ant.).

La invención además abarca agentes de unión específica derivados, por ejemplo, peptícueros, modificados de manera covalente para incluir una o más uniones de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol, como describen las patentes de Estados Unidos Nosº 4.640.835; 4.496.689;

4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; y 4.179.337. Otros polímeros útiles conocidos en la técnica incluyen monometoxipolietenglicol, dextrano, celulosa, u otros polímeros basados en hidratos de carbono, poli-(N-vinil pirrolidona)-polietenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxetilados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico, así como las mezclas de estos polímeros. Particularmente preferidos son los pepticuerpos modificados de manera covalente con subunidades de polietenglicol (PEG) 5 Polímeros hidrosolubles se pueden unir en posiciones específicas, por ejemplo en el extremo amino de pepticuerpos, o unirse al azar a una o más cadenas laterales del polipéptido. El uso de PEG para mejorar la capacidad terapéutica para los agentes de unión específica, por ejemplo, pepticuerpos, y para anticuerpos 10 humanizados en concreto, se describe en la Patente de EE.UU. Nº. 6. 133. 426 de Gonzales y col., emitida el 17 de octubre de 2000.

La invención también contempla la derivatización del péptido y/o parte del vehículo de los compuestos. Tales derivatizados pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, y similares, de los compuestos. Los restos pueden, como alternativa, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable del compuesto y similares. Ejemplos de derivados incluyen los compuestos en los que:

- 15 1. El compuesto o alguna parte del mismo es cíclico. Por ejemplo, la parte de péptido puede modificarse para contener dos o más residuos de Cys (por ejemplo, en el enlazador), que podría ciclarse mediante la formación de enlaces disulfuro.
- 20 2. El compuesto está reticulado o se vuelve capaz de reticular entre moléculas. Por ejemplo, la parte de péptido puede modificarse para contener dos o más residuos de Cys y, de ese modo, poder formar un enlace disulfuro intermolecular con una molécula similar. El compuesto puede reticularse además a través de su extremo C terminal.
- 25 3. Uno o más enlaces (uniones) peptídicos [-C(O)NR-] se sustituyen por un enlace no peptídico. Enlaces no peptídicos a modo de ejemplo son -CH₂-carbamato [-CH₂-OC(O)NR-], fosfonato, -CH₂-sulfonamida CH₂-S(O)₂NR-, urea [-NHC(O) NH-], -CH₂-amina secundaria y péptido alquilado [-C(O)NR⁶- en el que R⁶ es alquilo inferior].
- 30 4. El extremo N está derivatizado. Normalmente, el extremo N puede acilarse o modificarse para dar una amina sustituida. Ejemplos de grupos derivados N terminales incluyen NRR¹ (distinto de -NH₂), -NRC(O)R¹, -NRC(O)OR¹, -NRS(O)₂R¹, -NHC(O)NHR¹, succinimida o benciloxicarbonil-NH- (CBZ-NH-), en los que R y R¹ son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo inferior, y en los que el anillo fenilo puede sustituirse con 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que está constituido por alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, cloro y bromo.
- 35 5. El extremo C está derivatizado. Normalmente, el extremo C está esterificado o amidado. Por ejemplo, pueden usarse procedimientos descritos en la técnica para añadir (NH-CH₂-CH₂-NH₂)₂ a compuestos de la presente invención en el extremo C. Asimismo, pueden usarse procedimientos descritos en la técnica para añadir (NH₂ a compuestos de la presente invención en el extremo C. Ejemplos de grupos derivados en C terminal incluyen, por ejemplo, -C(O)R² en el que R² es alcoxi inferior o -NR³R⁴ en el que R³ y R⁴ son independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₈ (preferiblemente alquilo C₁-C₄).
- 40 6. Un enlace disulfuro se sustituye por otro resto de reticulación, preferentemente más estable (por ejemplo, un alquileno). Véase, por ejemplo, Bhatnagar (ant.); Alberts y col., Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9 (1993).
7. Uno o más residuos de aminoácidos individuales están modificados. Se sabe que diversos agentes de derivatización reaccionan de manera específica con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales, tal como se describe en detalle a continuación.

45 Pueden hacerse reaccionar residuos de lisinilo y residuos amino terminales con anhídridos de ácido succínico u otro ácido carboxílico, que invierten la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pantanodiona; y la reacción con glioíxilato catalizada por transaminasa.

50 Los residuos de arginilo pueden modificarse mediante la reacción con uno cualquiera o combinación de varios reactivos convencionales, incluyendo fenilglioal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginilo requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la alta pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo guanidino de epsilon-amino.

55 Se ha estudiado extensamente la modificación específica de residuos de tirosilo, con particular interés en la introducción de etiquetas espectrales en residuos de tirosilo mediante la reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más habitualmente se pueden usar N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies O-acetyl-tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.

Los grupos carboxilo de cadena lateral (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse de forma selectiva mediante la reacción con carbodiimidas (R'-N=C=N-R') tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etyl)carbodiimida o 1-etyl-3-(4-

azonia-4,4dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo pueden convertirse en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

Los residuos de glutaminilo y asparaginilo pueden desamidarse para dar los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo. Como alternativa, estos residuos se desamidan en condiciones ácidas suaves. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

5 Pueden sustituirse residuos de cisteínilo por residuos de aminoácidos u otros restos o bien para eliminar enlaces disulfuro o bien, por el contrario, para estabilizar las reticulaciones. Véase, por ejemplo Bhatnagar, (ant.).

10 La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular los péptidos o sus derivados funcionales a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros vehículos macromoleculares. Los agentes de reticulación de uso habitual incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato proporcionan compuestos intermedios fotoactivables que pueden formar reticulaciones en presencia de luz. Como alternativa, se pueden emplear matrices insolubles en agua reactivas, tales como hidratos de carbono activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE.UU. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 para la inmovilización de proteínas.

15 Los grupos hidratos de carbono (oligosacárido) pueden unirse de manera conveniente a sitios que se sabe que son sitios de glicosilación en proteínas. Generalmente, los oligosacáridos unidos a O se unen a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr), mientras que oligosacáridos unidos a N se unen a residuos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Preferentemente, X es uno de los 19 aminoácidos que se producen de manera natural distinto de prolina. Las estructuras de los oligosacáridos unidos a N o unidos a O y los residuos de azúcar encontrados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra habitualmente en ambos es ácido N-acetylneuramínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico es normalmente el residuo terminal de oligosacáridos tanto unidos a N como unidos a O, y, en base a su carga negativa, puede conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Tal(es) sitio(s) puede(n) incorporarse en el enlazador de los compuestos de la presente invención y está(n) preferentemente glicosilado(s) mediante una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamífero tales como CHO, BHK, COS). Sin embargo, tales sitios pueden glicosilarse adicionalmente mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

20 Otras modificaciones posibles incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o tetroxilo, oxidación del átomo de azufre en Cys, metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina (Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)].

25 35 Los compuestos de la presente invención se pueden cambiar a nivel de ADN también. La secuencia de ADN de cualquier parte del compuesto puede estar cambiada a codones más compatibles con la célula huésped elegida. Para *E. coli*, que es la célula huésped preferida, se conocen en la técnica codones optimizados. Los codones pueden estar sustituidos para eliminar sitios de restricción o para incluir sitios de restricción silenciosos, que pueden ayudar al procesamiento del ADN en la célula huésped seleccionada. Las secuencias del vehículo, el enlazador y el 40 ADN peptídico se pueden modificar para que incluyan cualquiera de los anteriores cambios en la secuencia.

Maduración de la afinidad:

45 Una realización de la presente invención incluye péptidos y pepticuerpos con "afinidad madurada". Este procedimiento contempla el incremento de la afinidad o de la bioactividad de los péptidos y pepticuerpos de la presente invención usando expresión en fagos u otras tecnologías de selección. Basándose en una secuencia de consenso (que se genera para una colección de péptidos relacionados), se pueden generar genotecas secundarias de expresión en fagos dirigidas en las que los aminoácidos "principales" (determinados a partir de la secuencia consenso) se mantienen constantes o se desvían en frecuencia de aparición. Como alternativa, se puede usar una secuencia de péptido individual para generar una genoteca de expresión en fagos desviada dirigida. El apelmazamiento de tales genotecas puede producir péptidos (que se pueden convertir en pepticuerpos) con un 50 unión potenciada a la Ang-2 o con una bioactividad potenciada.

Análogos no peptídicos/Miméticos proteicos

55 Además, también se contemplan los análogos no peptídicos que proporcionan una estructura estabilizada o con menor biodegradación. Los análogos de miméticos peptídicos se pueden preparar basándose en un péptido inhibidor seleccionado mediante susitución de uno o más residuos por restos no peptídicos. Preferentemente, los restos no peptídicos permiten que el péptido retenga su conformación natural o estabilizan una conformación preferida, por ejemplo, bioactiva que mantiene la capacidad de reconocer y unirse a Ang-2. En un aspecto, el análogo/mimético resultante muestra mayor afinidad de unión por Ang-2. Un ejemplo de procedimientos para la preparación de análogos de miméticos no peptídicos a partir de péptidos se describe en Nachman y col., Regul.

Pept. 57: 359 - 370 (1995). Si se desea, los péptidos de la invención se pueden modificar, por ejemplo, mediante glicosilación, amidation, carboxilación, o fosforilación, o mediante la creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres, en particular ésteres C-terminal, y derivados N-acilo de los péptidos de la invención. Los pepticuerpos también se pueden modificar para crear derivados de péptidos mediante la formación de complejos covalentes o no covalentes con otros restos. Los complejos unidos de manera covalente se pueden preparar mediante la unión de los restos químicos a grupos funcionales sobre las cadenas laterales de aminoácidos que comprenden los pepticuerpos, o en el extremo N- o extremo C-.

En particular, se anticipa que los péptidos se pueden conjugar a un grupo indicador incluyendo, pero sin limitación un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima (por ejemplo, que cataliza una reacción colorimétrica o fluorométrica), un substrato, una matriz sólida, o un vehículo (por ejemplo, biotina o avidina). De acuerdo con esto, la invención proporciona una molécula que comprende una molécula de pepticuerpo, en la que la molécula preferentemente comprende además un grupo indicador seleccionado entre el grupo constituido por un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima, un substrato, una matriz sólida, y un vehículo. Dichos marcadores son bien conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, los marcadores de biotina se contemplan particularmente. El uso de tales marcadores es bien conocido por los expertos en la técnica y se describe en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 3.817.837; 3.850.752; 3.996.345; y 4.277.437. Otras marcadores que pueden ser útiles incluyen, entre otros, marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes y marcadores quimioluminiscentes. Las patentes de Estados Unidos que conciernen al uso de tales marcadores incluyen, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; y 3.996.345. Cualquiera de los pepticuerpos de la presente invención puede comprender uno, dos, o más de cualquiera de estos marcadores.

Procedimientos de fabricación de péptidos

Los péptidos de la presente invención se pueden generar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, tales péptidos se pueden sintetizar en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Varios sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y se pueden usar de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young (supra); Tam y col., J. Am. Chem. Soc., 105:6442, (1983); Merrifield, Science 232:341-347 (1986); Barany y Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany y col., Int. J. Pep. Protein Res., 30:705-739 (1987); y las patentes de EE.UU. nº 5.424.398, cada una incorporada en el presente documento por referencia.

Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida usan un copoli(estrenodivinilbenceno) que contiene 0,1-1.0 mM aminas/g de polímero. Estos procedimientos para la síntesis de péptido usan protección con butiloxicarbonilo (t-BOC) o 9-fluorenilmetiloxicarbonil(FMOC) de grupos alfa-amino. Ambos procedimientos implican la síntesis por etapas mediante la cual se añade un único aminoácido a cada etapa comenzando a partir del extremo C del péptido (Véase, Coligan y col., *Curr. Prot. Immunol.*, Wiley Interscience, 1991, Unit 9). Tras la finalización de la síntesis química, el péptido sintético se puede desproteger para eliminar los grupos bloqueadores de aminoácido t-BOC o FMOC y escindirse del polímero mediante el tratamiento con ácido temperatura reducida (por ejemplo, HF-10% anisol líquido durante aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 hora a 0°C). Despues de la evaporación de los reactivos, los péptidos se extraen del polímero con solución de ácido acético al 1% que después se liofiliza para producir el material bruto. Normalmente, esto se puede purificar mediante tales técnicas como filtración de gel sobre SephadexG-15 usando 5% de ácido acético como disolvente. La liofilización de fracciones apropiadas de la columna producirá los péptidos o derivados de péptido homogéneos, que después se pueden caracterizar mediante técnicas convencionales tales como análisis de aminoácidos, cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alto rendimiento, espectroscopía de absorción por ultravioleta, rotación molar, solubilidad, y se cuantificaron mediante degradación Edman de fase sólida.

Otros procedimientos, tales como selección de péptidos a partir de una genoteca de expresión en fagos, están también disponibles. Las genotecas se pueden preparar a partir de conjuntos de aminoácidos como se describe en el presente documento. La Expresión en fagos puede ser particularmente eficaz en la identificación de péptidos útiles de acuerdo con la invención. En resumen, se prepara una genoteca de fagos (usando, por ejemplo, fago ml 13, fd, o lambda), que muestra inserciones de 4 a aproximadamente 80 residuos de aminoácidos. Las inserciones pueden representar, por ejemplo, una disposición completamente degenerada o desviada. Se pueden seleccionar inserciones portadoras del fago que se unen al antígeno deseado. Este procedimiento se puede repetir mediante varios ciclos de reselección de fagos que se unen al antígeno deseado. Las rondas repetidas conducen al enriquecimiento de los fagos portadores de secuencias concretas. Se puede llevar a cabo análisis de la secuencia de ADN para identificar las secuencias de los péptidos expresados. Se puede determinar la parte lineal mínima de la secuencia que se une al antígeno deseado. Se puede repetir el procedimiento usando una genoteca desviada que contiene inserciones que contienen parte o toda la parte lineal mínima más uno o más restos degenerados adicionales cadena arriba o cadena abajo de los mismos. Estas técnicas pueden identificar péptidos de la invención con una afinidad de unión a Ang-2 todavía mayor que los agentes ya identificados en el presente documento.

Con independencia del modo por el cual se preparan los péptidos, una molécula de ácido nucleico que codifica cada uno de tales péptidos y pepticuerpos se puede generar usando procedimientos de ADN recombinante convencionales. La secuencia de nucleótidos de tales moléculas de ADN se puede manipular según sea apropiado

sin cambiar la secuencia de aminoácidos que codifican para considerar la degeneración del código de ácido nucleico así como para considerar la preferencia de codón en células huésped concretas.

Las técnicas ADN recombinante son un procedimiento conveniente para preparar pepticuerpos de longitud completa y otros agentes proteináceos de tamaño grande de unión específica de la presente invención, o fragmentos de los mismos. Una molécula de ADN que codifica el pepticuerpo o fragmento se puede insertar en un vector de expresión, que puede, a su vez, insertarse en una célula huésped para la producción del anticuerpo o fragmento.

En general, una molécula de ADN que codifica un péptido o pepticuerpo se puede obtener usando los procedimientos descritos en el presente documento en el apartado de Ejemplos del presente documento. Las sondas y condiciones de hibridación típicas son aquellas tales como las que se establecen en Ausubel y col. (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press [1994]). Después de la hibridación, la mancha sondada se puede lavar con una rigurosidad adecuada, dependiendo de factores tales como el como tamaño de la sonda, homología esperada de la sonda para clonar el tipo de genoteca que se está seleccionando y el número de clones que se está seleccionando. Ejemplos de selección de alta rigurosidad son 0,1 X SSC, y 0,1 por ciento de SDS a una temperatura entre 50 -65°C.

15 También se pueden usar procedimientos de selección de dos híbridos de levadura para identificar péptidos de la invención que se unen al Ang-2. De este modo, el antígeno, o un fragmento del mismo, se puede usar para seleccionar genotecas de péptidos, incluyendo genotecas de expresión en fagos, para identificar y seleccionar agentes de unión a Ang-2, por ejemplo, pepticuerpos, de la presente invención.

20 Como alternativa, se pueden utilizar varios sistemas de expresión en vector/huésped para contener y expresar los péptidos de la invención. Estos sistemas incluyen, entre otros, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión con ADN recombinante de bacteriófago, plásmido o cósmico, levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras, sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión en virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacteriana (p. ej., plásmidos Ti o pBR322) sistemas de células animales. Las células de mamífero que son útiles en las producciones de proteína recombinante incluyen, entre otros, células VERO, células HeLa, líneas de células de ovario de Hámster Chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Ejemplos de protocolos para la expresión recombinante de los péptidos se describen en el presente documento más adelante.

30 La expresión "vector de expresión" se refiere a un plásmido, fago, virus o vector, que expresa un polipéptido a partir de una secuencia de ADN (ARN). Un vector de expresión puede comprender una unidad de transcripción que comprende un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una estructura o secuencia que codifica el agente de unión que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias de inicio y terminación de la transcripción apropiadas. Las unidades de transcripción para uso en sistemas de expresión de levaduras o eucarióticos incluyen, preferentemente, una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Como alternativa, cuando se expresa la proteína recombinante sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo amino terminal metionilo. Este residuo se puede o no escindir posteriormente a partir de la proteína recombinante expresada, para proporcionar un producto de péptido final.

40 Por ejemplo, los péptidos se pueden expresar de manera recombinante en levaduras usando un sistema de expresión comercialmente disponible, por ejemplo, el sistema de expresión en *Pichia* (Invitrogen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema también se basa en la secuencia pre-proalfa para dirigir la secreción, pero la transcripción del inserto está dirigida por el promotor de la alcohol oxidasa (AOX1) tras su inducción por metanol.

45 El péptido secretado se purifica del medio de crecimiento de levaduras usando, por ejemplo, los procedimientos usados para purificar el péptido de los sobrenadantes celulares de mamífero y bacterianos.

50 Como alternativa, el ADNc que codifica el péptido puede clonarse en el vector de expresión de baculovirus pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Este vector puede usarse según las instrucciones del fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en medios sin proteínas sF9 y para producir proteína recombinante. La proteína recombinante puede purificarse y concentrarse a partir de los medios usando una columna de heparina-Sefarosa (Pharmacia).

55 Como alternativa, el péptido o pepticuerpo puede expresarse en un sistema de insectos. Los sistemas de insectos para la expresión de proteínas son bien conocidos por los expertos en la técnica. En uno de estos sistemas se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o de *Trichoplusia larvae*. La secuencia que codifica el péptido se puede clonar en una región no esencial del virus, tal como el gen de poliedrina, y se colocará bajo el control del promotor de la poliedrina. La inserción satisfactoria del péptido inactivará el gen de poliedrina y producirá virus recombinante que carece de la proteína de recubrimiento. Los virus recombinantes se pueden usar para infectar células de *S. frugiperda* cells o *Trichoplusia larvae* en las que se expresa el péptido. Smith y col., J. Virol. 46: 584 (1983); Engelhard y col., Proc. Nat. Acad Sci. USA, 91: 3224-7 (1994).

En otro ejemplo, la secuencia de ADN que codifica el péptido puede amplificarse mediante PCR y clonarse en un vector apropiado por ejemplo, pGEX-3X (Pharmacia). El vector pGEX se diseña para producir una proteína de fusión que comprende glutatión-S-transferasa (GST), codificada por el vector, y una proteína codificada por un fragmento de ADN insertado en el sitio de clonación del vector. Los cebadores para la PCR pueden generarse para incluir, por ejemplo, un sitio de escisión apropiado. Cuando el resto de fusión únicamente se usa para facilitar la expresión o, de otro modo, no es deseable como unión al péptido de interés, puede escindirse la proteína de fusión recombinante de la parte de GST de la proteína de fusión. La construcción peptídica pGEX-3X/ágente de unión específica se transforma en células *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla CA), y se aíslan y se hacen crecer transformantes individuales. El ADN del plásmido de transformantes individuales puede purificarse y secuenciarse parcialmente usando un secuenciador automático para confirmar la presencia del inserción de ácido nucleico que codifica el agente de unión específico deseado en la orientación apropiada.

Ciertas composiciones peptídicas de la presente invención son aquéllas en las que un pepticuerpo se conjuga a cualquier péptido anti tumoral, tal como el factor de necrosis tumoral (TNF). En un procedimiento particularmente preferido, las quimeras de los péptidos del agente de unión específica de TNF se generan como fusiones recombinantes con las secuencias que codifican el péptido condensadas en el marco con las secuencias que codifican el TNF (Novagen, Madison, WI). El ADNc de péptido - TNF se puede clonar en el vector pET-11 b (Novagen) y la expresión de los péptidos-TNF en BL21 *E. coli* se puede inducir de acuerdo con las instrucciones del fabricante de pET11. Los péptidos de TNF solubles se pueden purificar a partir de lisados bacterianos mediante la preparación de sulfato de amonio, cromatografía de interacción hidrófoba sobre Fenil-Sefarosa 6 Fast Flow, cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sefarosa Fast Flow y cromatografía de filtración en gel sobre Sephacryl-S-300 HR.

La proteína de fusión, que se puede producir como un cuerpo de inclusión insoluble en las bacterias, se puede purificar como sigue. Las células huésped se pueden sacrificar mediante centrifugación; lavarse en NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; y tratarse con 0,1 mg/ml de lisozima (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El lisado se puede eliminar mediante sonicación, y los desechos celulares se pueden sedimentar mediante centrifugación durante 10 minutos a 12.000 X g. El sedimento que contiene la proteína de fusión se puede volver a suspender en Tris 50 mM, pH 8, y EDTA 10 mM, se separaron en fases sobre 50% de glicerol, y se centrifugaron durante 30 minutos a 6000 X g. El sedimento se volvió a suspender en solución salina tamponada con fosfato estándar (PBS) libre de Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺. La proteína de fusión se puede purificar adicionalmente mediante fraccionamiento del sedimento resuspendido en un SDS-PAGE desnaturizante (Sambrook y col., ant.). El gel se puede sumergir en KCl 0,4 M para visualizar la proteína, que se puede escindir y electroeluir en tampón de desarrollo por gel que carece de SDS. Si se produce GST/proteína de fusión en las bacterias en forma de una proteína soluble, se puede purificar usando el módulo de purificación GST (Pharmacia).

La proteína de fusión se puede someter a digestión para escindir el GST del péptido de la invención. La reacción de digestión (20 - 40 mg de proteína de fusión, 20 - 30 unidades de trombina humana, (4000 U/mg, Sigma) en 0,5 ml de PBS se puede incubar durante 16 - 48 horas a temperatura ambiente y cargarse en gel SDS-PAGE desnaturizante para fraccionar los productos de reacción. El gen se puede sumergir en 0,4 M KCl para visualizar las bandas de proteína. La identidad de la banda de proteína correspondiente al peso molecular esperado del péptido se puede confirmar mediante análisis de secuencia de aminoácidos usando un secuenciador automático (Applied Biosystems Model 473A, Foster City, CA). Como alternativa, la identidad se puede confirmar mediante la realización de HPLC y/o espectrometría de masas de los péptidos.

Como alternativa, una secuencia de ADN que codifica el péptido puede clonarse en un plásmido que contiene un promotor deseado y, opcionalmente, una secuencia líder [Better y col, Science 240:1041-43 (1988)]. La secuencia de esta construcción puede confirmarse mediante secuenciación automática. A continuación, el plásmido puede transformarse en la cepa MC1061 de *E. coli* usando procedimientos convencionales que emplean la incubación con CaCl₂ y tratamiento de choque térmico de las bacterias (Sambrook y col, ant.). Las bacterias transformadas pueden cultivarse en medio LB complementado con carbenicilina, y la producción de la proteína expresada puede inducirse mediante el crecimiento en un medio adecuado. Si está presente, la secuencia líder puede realizar la secreción del péptido y puede escindirse durante la secreción.

La proteína secretada recombinante puede purificarse a partir de los medios usando bacterianos mediante los procedimientos que se describen más adelante.

Los expertos en la técnica conocen bien los sistemas huéspedes mamíferos para la expresión de la proteína recombinante. Pueden seleccionarse cepas de células huésped de una capacidad particular para tratar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones postraduccionales que serán útiles para proporcionar actividad de proteína. Tales modificaciones de la proteína incluyen, entre otras, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Diferentes células huésped, tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y se pueden escoger para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña introducida.

Es preferible que las células transformadas se usen para la producción de proteínas de alto rendimiento a largo plazo. Una vez que se han transformado tales células con vectores que contienen marcadores seleccionables así

como el casete de expresión deseado, se puede dejar que las células crezcan durante 1-2 días en medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El marcador seleccionable está diseñado para conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. La proliferación de grupos de células transformadas de forma estable se puede realizar usando técnicas de cultivo tisular adecuadas al tipo de célula.

5 Para recuperar las células transformadas para la producción de proteínas recombinantes se pueden usar varios sistemas de selección. Tales sistemas de selección incluyen, entre otros, los genes de la timidina cinasa de HSV, de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y de adenina fosforribosiltransferasa, en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, puede usarse la resistencia anti-metabolitos como la base de selección para DHFR, que 10 confiere resistencia a metotrexato; gpt que confiere resistencia a ácido micofenólico; neo que confiere resistencia al aminoglicósido G418 y confiere resistencia a clorsulfurón; e hygro que confiere resistencia a higromicina. Genes 15 seleccionables adicionales que pueden ser útiles incluyen trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histidol en lugar de histidina. Los marcadores que proporcionan una indicación visual para la identificación de transformantes incluyen antocianinas, β -glucuronidasa y su sustrato, GUS y luciferasa y su sustrato, luciferasa.

Purificación y replegamiento de agentes de unión específica

En algunos casos, los agentes de unión específico, tales como los péptidos y/o pepticuerpos de la presente invención, 20 pueden necesitar "replegarse" y oxidarse para dar una estructura terciaria apropiada y generar enlaces disulfuro con el fin de ser biológicamente activos. El replegamiento puede realizarse usando varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, exponer el agente polipeptídico solubilizado a un pH normalmente superior a 7 en presencia de un agente caotrópico. La selección de un caótropo es similar a las 25 elecciones usadas para la solubilización de cuerpos de inclusión, sin embargo un caótropo se usa normalmente a una concentración inferior. Un ejemplo de agente caotrópico es guanidina. En la mayoría de los casos, la disolución de replegamiento/oxidación contendrá también un agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox concreto que permite que se produzcan intercambios de disulfuro para la 30 formación de puentes de cisteína. Algunas parejas redox usadas habitualmente incluyen cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditiotreitol DTT/ditiano DTT, y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. En muchos 35 casos, puede usarse un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento. Los codisolvientes de uso habitual incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, y arginina.

30 Puede ser deseable purificar los péptidos y pepticuerpos de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas de purificación de proteínas. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento bruto de las fracciones proteináceas y no proteináceas. Habiendo separado el péptido y/o pepticuerpo de otras proteínas, el péptido o polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y 35 electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o la purificación hasta la homogeneidad). Ciertos procedimientos analíticos adecuados para la preparación de pepticuerpos y péptidos de la presente invención son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida; enfoque isoelectrónico. Un procedimiento particularmente eficaz de purificación de péptidos es la cromatografía líquida rápida de 40 proteínas o incluso la HPLC.

40 Ciertos aspectos de la presente invención se refieren a la purificación, y en realizaciones particulares, a la purificación sustancial, de un pepticuerpo o péptido de la presente invención. La expresión "pepticuerpo o péptido purificado", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición, que puede aislarse de otros componentes, en la que el pepticuerpo o péptido está purificado hasta un grado con respecto al estado en que 45 puede obtenerse de manera natural. Por tanto, un péptido o pepticuerpo purificado se refiere también a un pepticuerpo o péptido que está libre del entorno en el que puede producirse de manera natural.

45 Generalmente, "purificado" se referirá a una composición de péptido o pepticuerpo que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros diversos componentes y que conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificada", esta designación hará referencia a una composición de péptido o pepticuerpo en la que el péptido o pepticuerpo forma el componente principal de la 50 composición, de modo que constituye aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 95 % o más de las proteínas en la composición.

55 Los expertos en la técnica conocerán diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación del péptido o pepticuerpo a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad de unión específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de péptido o pepticuerpo dentro de una fracción mediante análisis de SDS/PAGE. Un procedimiento preferido para evaluar la pureza de una fracción de péptido o pepticuerpo es calcular la actividad específica de la fracción, comparar la actividad con la actividad específica del extracto inicial y, por tanto, calcular el grado de purificación, evaluado en el presente documento mediante un "veces el número de 60 purificación". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad de unión dependerán por supuesto, de la técnica de ensayo concreta elegida para seguir la purificación y si el pepticuerpo o péptido muestra o no una actividad de unión detectable.

Los expertos en la técnica conocerán bien diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación. Éstas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos (inmunoprecipitación) y similares o mediante desnaturalización térmica, seguida de centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía de afinidad (por ejemplo, proteína-A-Sefarosa), cromatografía de intercambio iónico, de filtración en gel, de fase inversa, de hidroxiapatita y de afinidad; enfoque isoelectrónico; electroforesis en gel; y combinaciones de tales y otras técnicas. Tal como se conoce generalmente en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse o que ciertas etapas puedan omitirse, y todavía de como resultado un procedimiento adecuado para la preparación de un agente de unión sustancialmente purificado.

No existe ningún requisito general de que el péptido o peptícuero de la presente invención se proporcionen siempre en su estado más purificado. De hecho se contempla que productos de agentes de unión purificados menos sustancialmente tendrán utilidad en ciertas realizaciones. Puede realizarse la purificación parcial usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando formas diferentes del mismo esquema general de purificación. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC dará como resultado, generalmente, una purificación "tantas veces" mayor que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los procedimientos que muestran un grado inferior de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del péptido o peptícuero o en el mantenimiento de la actividad de unión del péptido o peptícuero.

Se sabe que la migración de un péptido o polipéptido puede variar, algunas veces de manera significativa, con diferentes condiciones de SDS/PAGE [Capaldi y col, Biochem Biophys Res Comm, 76: 425 (1977)]. Por tanto, se apreciará que, en condiciones de electroforesis diferentes, pueden variar los pesos moleculares aparentes de los productos de expresión de agentes de unión purificados o parcialmente purificados.

Ensayos de unión

Los ensayos de unión inmunológica típicamente usan un agente de captura para unirse específicamente a, y a menudo inmovilizar, el antígeno diana del analito. El agente de captura es un resto que específicamente se une al analito. En una realización de la presente invención, el agente de captura es un péptido o peptícuero o fragmento del mismo, que específicamente se une a Ang-2. Estos ensayos inmunológicos se conocen bien en la técnica [Asai, ed., Methods in Cell Biology, Vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., New York (1993)]

Los ensayos de unión inmunológicos frecuentemente utilizan un agente de marcaje que señalará la existencia del complejo unido, formado por el agente de captura y el antígeno. El agente marcador puede ser una de las moléculas que comprenden el complejo unido, es decir, puede ser un agente de unión específica marcado o un anticuerpo anti-agente de unión específica marcado. Como alternativa, el agente marcador puede ser una tercera molécula, habitualmente otro anticuerpo, que se une al complejo unido. El agente marcador puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-agente de unión específica que lleva una marca. El segundo anticuerpo, específico del complejo de unión, puede carecer de una marca, pero se puede unir mediante una cuarta molécula específica a las especies de anticuerpos cuyo segundo anticuerpo es un miembro de Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede estar modificado con un resto detectable, tal como biotina, que después se puede unir mediante una cuarta molécula, tal como estreptavidina marcada con enzima. Otras proteínas capaces de unirse específicamente a las regiones constantes de inmunoglobulina, tales como la proteína A o proteína G, también se pueden usar como agente marcador. Estas proteínas de unión son constituyentes normales de las paredes celulares de bacterias estreptocócicas y muestran una fuerte reactividad no inmunogénica con las regiones constantes de inmunoglobulina de diversas especies. Akerstrom, J. Immunol., 135:2589-2542 (1985); Chaubert, Mod. Pathol., 10:585-591 (1997).

A lo largo de los ensayos, se pueden requerir las etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar entre aproximadamente 5 segundos a varias horas, preferentemente entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, el analito, el volumen de solución, las concentraciones, y similares. Usualmente, los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque se pueden llevar a cabo en un intervalo de temperaturas.

A. Ensayos de unión no competitiva:

Los ensayos de unión inmunológicos pueden ser del tipo no competitivo. Estos ensayos tienen una cantidad de analito capturado que se mide directamente. Por ejemplo, en un ensayo de tipo "sándwich" preferido, el agente de captura (anticuerpo o peptícuero) se puede unir directamente a un sustrato sólido donde se inmoviliza. Estos agentes de captura inmovilizados capturan (se unen a) después al antígeno presente en la muestra de ensayo. La proteína así inmovilizada se une después a un agente marcador, tal como un segundo anticuerpo que tiene una marca. En otro ensayo de tipo "sándwich" preferido, el segundo anticuerpo carece de una marca, pero se puede unir mediante un anticuerpo marcado específico para anticuerpos de las especies a partir de las que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo también se puede modificar con un resto detectable, tal como biotina, al que se puede unir específicamente una tercera molécula marcada, tal como estreptavidina. Véase Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988), incorporado en el presente documento por referencia.

B. Ensayos de unión competitiva:

Los ensayos de unión inmunológicos pueden ser del tipo competitivo. La cantidad de analito presente en la muestra se mide indirectamente mediante la medición de la cantidad de un analito añadido desplazado, o que compite lejos, a partir de un agente de captura (anticuerpo o pepticuerpo) mediante el analito presente en la muestra. En un ensayo de unión competitiva preferido, se añade una cantidad conocida de analito, normalmente marcado, a la muestra y después la muestra se pone en contacto con el agente de captura. La cantidad de analito marcado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra (Véase, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cap. 14, pág. 579-583, ant.).

En otro ensayo de unión competitiva preferido el agente de captura se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La cantidad de proteína unida al agente de captura se puede determinar bien mediante la medición de la cantidad de la proteína presente en un complejo proteína/anticuerpo o, como alternativa, mediante la medición de la cantidad de proteína remanente que no está formando complejo. La cantidad de proteína puede detectarse mediante la provisión de una proteína marcada. Harlow y Lane (supra).

En otro ensayo de unión competitiva preferido más se utiliza la inhibición de hapteno. Aquí, se inmoviliza un analito conocido sobre un sustrato sólido. Se añade una cantidad conocida de anticuerpo a la muestra y la muestra se pone en contacto con el analito inmovilizado. La cantidad de anticuerpo unido al analito inmovilizado es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. La cantidad de anticuerpo inmovilizado se puede detectar mediante la detección de o bien la fracción inmovilizada de anticuerpo o la fracción que permanece en solución. La detección puede ser directa cuando el anticuerpo está marcado o indirecta mediante la posterior adición de un resto marcado que se une de manera específica al anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

C. Utilización de ensayos de unión competitiva:

Los ensayos de unión competitiva se pueden usar para determinaciones de reacción cruzada que permiten determinar a los expertos en la técnica si un complejo de proteínas o de enzimas que es reconocido por un pepticuerpo de la invención es la proteína deseada y no una molécula de reacción cruzada o para determinar si el pepticuerpo es específico del antígeno y no se une a antígenos no relacionados. En ensayos de este tipo, el antígeno se puede inmovilizar a un soporte sólido y una mezcla de proteína desconocida se añade al ensayo, que competirá con la unión de los pepticuerpos a la proteína inmovilizada. La molécula de competición también se une a uno o más antígenos no relacionados con el antígeno. La capacidad de las proteínas para competir con la unión de los pepticuerpos al antígeno inmovilizado se compara con la unión mediante la misma proteína que se inmovilizó al soporte sólido para determinar la reactividad cruzada de la mezcla de proteínas.

D. Otros ensayos de unión

La presente invención también proporciona procedimientos de inmunotransferencias tipo Western para detectar o cuantificar la presencia de Ang-2 en una muestra. La técnica generalmente comprende separar proteínas de la muestra mediante electroforesis en gel en base al peso molecular y transferir las proteínas a un soporte sólido adecuado, tal como filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o un filtro de nailon derivatizado. La muestra se incuba con los pepticuerpos o fragmento de los mismos que se unen específicamente a la Ang-2 y se detecta el complejo resultante. Estos pepticuerpos pueden marcarse directamente o, como alternativa, pueden detectarse posteriormente usando anticuerpo marcados que se unen específicamente al pepticuerpo.

40 Ensayos diagnósticos

Los agentes de unión derivatizados, tales como péptidos y pepticuerpos o fragmentos de los mismos, de la presente invención son útiles para el diagnóstico de afecciones o enfermedades caracterizadas por la expresión de Ang-2 o subunidades, o en ensayos para controlar a los pacientes que se están tratando con inductores de Ang-2, sus fragmentos, agonistas o inhibidores de la actividad de Ang-2. Entre las pruebas diagnósticas para Ang-2 se incluyen procedimientos que usan un pepticuerpo y un marcador para detectar Ang-2 en fluidos del cuerpo humano o extractos de células o tejidos. Los pepticuerpos de la presente invención se pueden usar con o sin modificación. En un ensayo de diagnóstico preferido, los pepticuerpos se marcarán mediante unión de, por ejemplo, una marca o una molécula indicadora. Se conocen una amplia diversidad de marcas y moléculas indicadoras, alguna de las cuales ya se han descrito en el presente documento. En particular, la presente invención es útil para la diagnosis de enfermedad humana.

En la técnica se conocen diversos protocolos para medir las proteínas de Ang-2 que usan pepticuerpos específicos para la proteína respectiva. Los ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo de dos puntos basado en anticuerpos monoclonales usando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítopos no interferentes sobre Ang-2, pero se puede emplear un ensayo de unión competitiva. Estos ensayos se describen, por ejemplo, en Maddox y col., J. Exp. Med, 158:1211 (1983).

Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico, habitualmente se establecen valores normales o

convencionales para la expresión de Ang-2 humana. Esta determinación se puede llevar a cabo mediante la combinación de fluidos corporales o extractos de células de sujetos normales, preferentemente humanos, con un pepticuerpo para Ang-2, en condiciones adecuadas para la formación de complejos que se conocen bien en la técnica. La cantidad de formación de complejo estándar se puede cuantificar mediante la comparación de la unión de los pepticuerpos a cantidades conocidas de proteína de Ang-2, tanto con muestras control como de enfermedad. A continuación, los valores convencionales obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por una enfermedad. La desviación entre los valores convencionales y del sujeto sugiere un papel para Ang-2 en el estado patológico.

Para aplicaciones de diagnóstico, en ciertas realizaciones los pepticuerpos o péptidos de la presente invención típicamente se marcarán con un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que sea capaz de producir, bien directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano. Bayer y col., Meth. Enz., 184: 138-163, (1990).

15 Enfermedades

La presente invención proporciona un agente de unión que es un pepticuerpo que comprende la SEC ID Nº 25 que se une a Ang-2, que es útil para el tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas humanas. Los agentes que modulan la actividad de unión de Ang-2, u otra actividad celular, se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos para potenciar sus efectos terapéuticos o disminuir los efectos secundarios potenciales.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona reactivos y procedimientos útiles para el tratamiento de enfermedades y afecciones caracterizadas por niveles no deseables o aberrantes de actividad de Ang-2 en una célula. Estas enfermedades incluyen cánceres y otras afecciones hiperproliferativas, tales como hiperplasia, psoriasis, dermatitis de contacto, trastornos inmunológicos e infertilidad.

Composiciones Farmacéuticas

25 Las composiciones farmacéuticas de agentes de unión específica de Ang-2 tales como pepticuerpos están dentro del ámbito de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos se describen con detalle en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos nº 6.171.586, de Lam y col., emitida el 9 de enero de 2001. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un agente de unión específica, tal como se describe en el presente documento en mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender agentes de unión específica antagonistas que modulan parcialmente o completamente al menos una actividad biológica de Ang-2 en mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los agentes de unión específica estarán suficientemente purificados para la administración a un animal.

35 La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, entre otros, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes de

40 carga (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes de formación de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes; agentes aromatizantes y de dilución; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones de formación de sal (tal como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato

50 80, trítón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metal alcalino (preferentemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

55 La composición farmacéutica óptima la determinará un experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración pretendida, el formato de liberación y la dosificación deseada. Véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, ant. Dichas composiciones pueden influir sobre el estado físico, la estabilidad, la velocidad de la liberación in vivo y la velocidad del aclaramiento in vivo del agente de unión específico.

El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido

- cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales habituales en composiciones para la administración parenteral. Otros ejemplos de vehículos son solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica. Otros ejemplos de composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. Pueden prepararse composiciones de agentes de unión para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1995) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, el producto de agente de unión puede formularse como liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.
- 10 Las composiciones farmacéuticas pueden seleccionarse para administración parenteral. Como alternativa, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para liberación enteral tal como por vía oral, por vía auditiva, por vía oftálmica, por vía rectal por vía vaginal. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de los conocimientos de la técnica.
- 15 Los componentes de formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.
- 20 Cuando se considera la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en la presente invención pueden estar en forma de una solución acuosa, parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que comprende el agente de unión específica deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que un agente de unión se formula como una solución isotónica, estéril, conservada de manera apropiada. Otra preparación más puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerpcionables, compuestos poliméricos (ácido poliláctico), ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporciona la liberación controlada o sostenida del producto que, por tanto, puede administrarse por medio de una inyección de liberación lenta. También puede usarse ácido hialurónico y esto puede tener el efecto de estimular la duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración de fármacos implantables.
- 25 En otro aspecto, pueden formularse formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Adicionalmente se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos, o liposomas.
- 30 35 También pueden usarse para la liberación aminopolímeros poliacidómicos no lipídicos. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones muy concentradas.
- 40 Una composición farmacéutica puede formularse para inhalación. Por ejemplo, un agente de unión puede formularse como polvo seco para inhalación. También pueden formularse soluciones para inhalación de moléculas de ácido nucleico o de polipéptido con un agente propelente para la liberación de aerosol. En otra realización más, pueden nebulizarse soluciones. Se describe además la administración pulmonar en la solicitud de PCT n.º PCT/US94/001875, que describe la liberación pulmonar de proteínas químicamente modificadas.
- 45 50 También se contempla que ciertas formulaciones pueden administrarse por vía oral. Se pueden formular moléculas de agente de unión que se administran de este modo con o sin los vehículos usados normalmente en la composición de formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula de agente de unión. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.
- 55 Composiciones farmacéuticas para administración oral también se pueden formular usando soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica con posologías adecuadas para la administración oral. Dichos soportes permiten formular las composiciones farmacéuticas en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para ingestión por el paciente.
- 60 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mediante combinación de compuestos activos con excipientes sólidos y procesando la mezcla de gránulos resultante (opcionalmente después de moler), para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Si se desea pueden añadirse agentes auxiliares adecuados. Excipientes adecuados incluyen cargas de hidratos de carbono o proteínas, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa, tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; gomas, incluyendo arábiga y tragacanto; y

proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar y ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se pueden usar junto con recubrimientos adecuados, tales como soluciones de azúcar concentrado, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación de productos o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir dosificación.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral también incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un revestimiento tal como glicerol o sorbitol.

Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con cargas o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquido o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de agente de unión en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse disoluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, entre otros, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican moléculas de agente de unión en formulaciones de liberación sostenida o controlada. Los expertos en la técnica conocen también técnicas para formular una variedad de otros medios de liberación sostenida o controlada, tales como vehículos de liposoma, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación lenta. Véase por ejemplo, el documento PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la liberación de composiciones farmacéuticas. Ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímero semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (documentos U.S. 3.773.919, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato [Sidman y col, Biopolymers, 22:547-556 (1983)], poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) [Langer y col, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981); y [Langer y col, Chem. Tech., 12:98-105(1982)], acetato de etilenvinilo (Langer y col., ant.) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133,988). Las composiciones de liberación sostenida también incluyen liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios procedimientos conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Eppstein y col, PNAS (EE.UU.), 82:3688 (1985); documento EP 36.676; documento EP 88.046; documento EP 143.949.

La composición farmacéutica que se va a usar para la administración in vivo normalmente debe ser estéril. Esto puede realizarse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Si la composición está liofilizada, la esterilización usando este procedimiento puede realizarse o bien antes de o bien tras la liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en solución. Además, las composiciones parenterales se colocan generalmente en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, un vial o bolsa de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse o bien en forma lista para su uso o bien en forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

Se pueden contemplar kit para producir una administración monodosis. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína secada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. Kits pueden contener jeringas precargadas de una única cámara o múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquidos y liojeringas).

Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que va a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos y contexto terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán, por tanto, dependiendo, en parte, de la molécula liberada, la indicación para la que está usándose la molécula de agente de unión, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y estado (la edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede valorar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, en función de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede variar desde 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o de 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg; o de 5 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente bien en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, tales como ratones, ratas, conejos, perros, cerdos o monos. Un modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentraciones adecuado y la vía de administración. Tal información se puede usar después para determinar dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

5 La dosificación exacta se determinará a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere el tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del compuesto activo o para mantener el efecto deseado. Entre los factores que se pueden tener en cuenta se incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la hora y la frecuencia de administración, la(s) combinaciones de fármacos, las sensibilidades de la reacción y la respuesta al tratamiento. Las 10 composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y el índice de aclaramiento de la formulación concreta.

15 La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de agente de unión en la formulación usada. Normalmente, una composición se administra hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. Por tanto, la composición puede administrarse como dosis única, o como dosis múltiple (en las concentraciones/dosificaciones iguales o diferentes) con respecto al tiempo o como infusión continua. De manera rutinaria se realiza un perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada. Pueden comprobarse dosificaciones apropiadas mediante el uso de datos de respuesta a la dosis apropiados.

20 La vía de administración de la composición farmacéutica se según los procedimientos conocidos, por ejemplo por vía oral, a través de inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatoso), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, medios intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmico, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópico, sublingual, uretral, vaginal o rectal, mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. Cuando se 25 deseé, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.

25 Como alternativa o adicionalmente, la composición puede administrarse por vía local por medio de implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser por medio de difusión, bolo de liberación gradual o administración continua.

30 En algunos casos puede ser deseable usar composiciones farmacéuticas de manera *ex vivo*. En tales casos, las células, los tejidos u órganos que se han extraído del paciente se exponen a las composiciones farmacéuticas tras lo cual las células, los tejidos y/u órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.

35 En otros casos, un agente de unión de la presente invención, tal como un pepticuerpo, puede liberarse mediante la implantación de ciertas células que se han modificado mediante ingeniería genética, usando procedimientos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar el polipéptido. Tales células pueden ser 40 células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Opcionalmente, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son, normalmente, membranas o envolturas poliméricas, semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación del (de los) producto(s) de proteína pero evitan la destrucción de las células mediante el sistema inmunitario del paciente o mediante otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

Terapia de combinación

45 Los agentes de unión específica de la invención (tales como pepticuerpos) se pueden utilizar en combinación con otros agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades asociadas a la expresión de Ang-2. Estos otros agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo tratamiento por radiación, quimioterapia, y terapias dirigidas tal como Herceptin™, Rituxan™, Gleevec™, y similares. Las terapias de combinación adicionales no enumeradas específicamente en el presente documento también están dentro del ámbito de la presente invención.

50 Por tanto, la invención incluye la administración de uno o más agentes de unión específica de la invención administrados al mismo paciente en combinación con uno o más agente(s) adicionales adecuados, administrándose cada uno de acuerdo con un régimen adecuado para dicho medicamento. Esto incluye la administración concurrente de un agente de unión específica de la invención y uno o más agentes adecuados. Como se usa en el presente documento, las expresiones "administrado de forma concurrente" y "administración concurrente" abarcan la administración sustancialmente simultánea de uno o más agentes de unión específica (tal como un péptido o pepticuerpo) de acuerdo con la invención y uno o más agentes de unión específica adicionales.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión administracióm "de forma no concurrente" abarcan la administración de uno o más agentes de unión selectivos (tal como un péptido o pepticuerpo) de acuerdo con la invención y uno o más agentes de unión específica adicionales, en diferentes momentos, en cualquier orden, solapando o no. Esto incluye, entre otros, tratamiento secuencia (tal como pretratamiento, postratamiento o

tratamiento solapante) con los componentes de la combinación, así como regímenes en los que los fármacos se alternan o en los que un compuesto se administra a largo plazo y el(s) otro(s) se administran de forma intermitente. Los componentes se pueden administrar en las mismas o distintas composiciones y por las mismas o diferentes vías de administración.

- 5 El tratamiento con quimioterapia puede emplear agentes antineoplásicos, incluidos, por ejemplo, agentes alquilantes, que incluyen: mostazas de nitrógeno, tales como meclor-etamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan y clorambucilo; nitrosoureas, tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), y semustina (metil-CCNU); etileniminas/metilmelamina tales como trietilenmelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametilmelamina (HMM, altretamina); sulfonatos de alquilo tales como busulfán; triazinas tales como dacarbazina (DTIC); antimetabolitos que incluyen análogos de ácido fólico, tales como metotrexato y trimetrexato, análogos de pirimidina, tales como 5-fluorouracilo, fluorodeoxiuridina, gencitabina, citosina arabinósido (AraC, citarabina), 5-azacitidina, 2,2'-difluorodeoxicitidina, análogos de purina tales como 6 mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2' desoxicofomicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fludarabina fosfato, y 2-clorodeoxiadenosina (cladribina, 2-CdA); productos naturales que incluyen fármacos antimitóticos tales como paclitaxel, alcaloides de vinca, incluyendo vinblastina (VLB), vincristina, y vinorelbina, taxotere, estramustina, y estramustina fosfato; pipodophilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos, tales como actimomicina D, daunomicina (rubidomicina), doxorubicina, mitoxantrona, idarubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C, y actinomicina; enzimas tales como L-asparaginasa; modificadores de la respuesta biológica tales como interferón-alfa, IL-2, G-CSF y GM-CSF; agentes varios, que incluyen complejos de coordinación de platino tales como cisplatino y carboplatino, antracenedionas tales como mitoxantrona, urea sustituida tales como hidroxiurea, derivados de metilhidrazina que incluyen N-metilhidrazina (MIH) y procarbazina, supresores adrenocorticales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas incluyendo antagonistas adrenocorticosteroides tales como prednisona y equivalentes, dexametasone y aminoglutetimida; progestina tales como hidroxiprogesterona caproato, medroxiprogesterona acetato y megestrol acetato; estrógeno tales como dietilstilbestrol y equivalentes de etinil estradiol; antiestrógeno tales como tamoxifeno; andrógenos incluyendo testosterona propionato y equivalentes de fluoximesterona; antiandrógenos tales como flutamida, análogos de hormonas que liberan gonadotropina y leuprolida; y non-steroidal antiandrógenos no esteroides tales como flutamida.
- 30 La terapia de combinación con factores de crecimiento pueden incluir citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento, u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, BL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, factor de células madre y eritropoyetina. Otras composiciones pueden incluir angiopoyetinas conocidas, por ejemplo Ang-1, -2, -4, -Y, y/o el polipéptido de tipo Ang y/o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los factores de crecimiento incluyen angiogenina, proteína-1 morfogénica de hueso, proteína-2 morfogénica de hueso, proteína-3 morfogénica de hueso, proteína-4 morfogénica de hueso, proteína 5 morfogénica de hueso, proteína-6 morfogénica de hueso, proteína-7 morfogénica de hueso, proteína-8 morfogénica de hueso, proteína-9 morfogénica de hueso, proteína-10 morfogénica de hueso, proteína-11 morfogénica de hueso, proteína-12 morfogénica de hueso, proteína-13 morfogénica de hueso, proteína-14 morfogénica de hueso, proteína-15 morfogénica de hueso, receptor de proteína IA morfogénica de hueso, proteína receptor IB morfogénica de hueso, factor neurotrófico derivado de cerebro, factor neurotrófico ciliar, receptor del factor neutrófico ciliar, factor 1 quimiotáctico neutrófilo inducido por citoquinas, neutrófilo inducido por citoquinas, factor 2 quimiotáctico, factor 2 quimiotáctico neutrófilo inducido por citoquinas, factor de crecimiento de células endoteliales, endotelial 1, factor de crecimiento epidérmico, atrayente de neutrófilos derivado del epitelio, factor de crecimiento 4 de fibroblastos 4, factor 5 de crecimiento de fibroblastos, factor 6 de crecimiento de fibroblastos, factor 7 de crecimiento de fibroblastos, factor 8 de crecimiento de fibroblastos, factor 8b de crecimiento de fibroblastos, factor 8c de crecimiento de fibroblastos, factor 9 de crecimiento de fibroblastos, factor 10 de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor-1 del factor neutrófico derivado de la línea celular glial, receptor-2 del factor neutrófico derivado de la línea celular glial, proteína, relacionada con el crecimiento, proteína-1 relacionada con el crecimiento, proteína-2 relacionada con el crecimiento, proteína-3 relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor I de crecimiento de tipo insulina, receptor del factor de crecimiento de tipo insulina, factor II de crecimiento de tipo insulina, proteína de unión del factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor-1 del factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de los nervios, receptor del factor de crecimiento de los nervios, neurotropina-3, neurotrophin-4, factor de crecimiento de placenta, factor 2 de crecimiento de placenta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena del factor A de crecimiento derivado de plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de plaquetas, factor AB de crecimiento derivado de plaquetas, cadena del factor B de crecimiento derivado de plaquetas, factor BB de crecimiento derivado de plaquetas, receptor-1 del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor-2 del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de estimulación de crecimiento de las células pre-B, factor de las células del tronco, receptor del factor de las células del tronco, factor 1 de crecimiento de transformación, factor 2 de crecimiento de transformación, factor 1 de crecimiento de transformación, factor 1.2 de crecimiento de transformación, factor 3 de crecimiento de transformación, factor 5 de crecimiento de transformación, factor 1 de crecimiento de transformación latente, proteína I de unión al factor 1 de crecimiento de transformación, proteína II de unión al factor 1 de crecimiento de transformación.

transformación, proteína III de unión al factor 1 de crecimiento de transformación, tipo I del receptor del factor de necrosis tumoral, tipo II del receptor del factor de necrosis tumoral, receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, factor de crecimiento endotelial vascular, y proteínas químéricas y sus fragmentos biológica o inmunológicamente activos.

5 Se apreciará que los agentes de unión específica (tales como péptidos o pepticuerpos) de la invención se pueden administrar con uno o más agentes antiinflamatorios. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente antiinflamatorio" se refiere, en general, a un agente que reduce la inflamación o tumefacción en un paciente. En el presente documento se citan numerosos agentes antiinflamatorios, pero se apreciará que puede haber agentes antiinflamatorios adicionales no citados específicamente en el presente documento, pero que entran dentro de la 10 presente invención.

15 El agente antiinflamatorio puede ser, por ejemplo, un compuesto que inhibe la interacción de citoquinas inflamatorias con sus receptores. Ejemplos de inhibidores de citoquinas útiles en combinación con los agentes de unión específica de la invención incluyen, por ejemplo, antagonistas (tales como anticuerpos) de TGF- β , así como antagonistas (tales como anticuerpos) dirigidos contra interleuquinas implicadas en la inflamación. Dichas interleuquinas se describen en el presente documento e incluyen, preferentemente, entre otros, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, e IL-18. Véase Feghali, y col., *Frontiers in Biosci.*, 2:12-26 (1997).

20 Los agentes de unión específica de la invención también se pueden administrar en combinación con inhibidores de la proteína quinasa A de tipo 1 para potenciar la proliferación de células T en pacientes infectados por VIH que están recibiendo terapia antirretroviral.

25 Los factores de crecimiento neural (NGF) también se pueden combinar con los agentes de unión específica de la invención para tratar ciertas afecciones. Dichas afecciones incluyen enfermedades neurodegenerativas, lesiones de la médula espinal y esclerosis múltiple. Otras afecciones que se pueden tratar con esta combinación son glaucoma y diabetes.

30 Una terapia de combinación preferida se refiere a un agente de unión específica de la invención administrado a un paciente en combinación con uno o más inhibidor adecuado de la IL-1. Inhibidores de la IL-1 incluyen, entre otros, fragmentos peptídicos de IL-1 de unión al receptor, anticuerpos dirigidos contra IL-1 o IL-1 beta o el receptor de tipo 1 de IL-1, y proteínas recombinantes que comprenden todo o partes de los receptores de IL-1 o variantes modificadas de los mismos, incluidas mutáneas genéticamente modificadas, formas multiméricas y formulaciones de liberación sostenida. Antagonistas específicos incluyen polipéptidos de IL-1ra, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 beta (ICE), anticuerpos antagonistas del receptor de IL-1 de tipo 1, formas de unión a IL-1 del receptor 1 de la IL-1 y del receptor de tipo II de IL-1, anticuerpos frente a IL-1, incluidos IL-1 alfa e IL-1 beta y otros miembros de la familia de IL-1 y un terapéutico conocido como IL-1 Trap (Regeneron). Los polipéptidos de IL-1ra incluyen las formas de IL-1ra descritas en la patente de EE.UU. nº 5.075.222 y formas modificadas y variantes, incluidas las descritas en los documentos U.S. 5.922.573, WO 91/17184, WO 92 16221, y WO 96 09323. Inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 beta (ICE) incluyen inhibidores de ICE de peptidilo y de molécula pequeña, incluidos los descritos en las solicitudes de patente PCT WO 91/15577; WO 93/05071; WO 93/09135; WO 93/14777 y WO 93/16710; y la solicitud de patente europea 0 547 699. Los compuestos no peptidilo incluyen los descritos en solicitud de patente PCT WO 95/26958, la patente de EE.UU. nº 5.552.400, la patente de EE.UU. nº 6.121.266, y Dolle y col., *J. Med Chem.*, 39, pp. 2438-2440 (1996). Otros inhibidores de ICE se describen en las patentes de EE.UU. nº 6.162.790. 6.204.261. 6.136.787. 6.103.711. 6.025.147. 6.008.217. 5.973.111. 5.874.424. 5.847.135. 5.843.904. 5.756.466. 5.656.627. 5.716.929. Las formas de unión a IL-1 del receptor de Type I de IL-1 y del receptor de tipo II de IL-1 se describen en las patentes de EE.UU. nº 4.968.607, 4.968.607, 5.081.228, Re 35.450, 5.319.071 y 5.350.683. Otros antagonistas de IL-1 adecuados incluyen, entre otros, péptidos derivados de la IL-1 que son capaces de unirse de forma competitiva al receptor de señalización de IL-1, IL-1 R de tipo I. Guías adicionales sobre ciertos antagonistas de IL-1 (y otra citoquina) se pueden encontrar en la patente de EE.UU. nº 6.472.179.

45 Adicionalmente, los inhibidores de TNF son adecuados e incluyen, entre otros, fragmentos peptídicos de unión al receptor de TNF α , oligonucleótidos antisentido o ribozimas que inhiben la producción de TNF α , anticuerpos dirigidos contra TNF α y proteínas recombinantes que comprenden todo o partes de los receptores de TNF α o variantes modificadas de los mismos, incluidas mutáneas genéticamente modificadas, formas multiméricas y formulaciones de liberación sostenida. También son adecuados los inhibidores de TACE (enzima convertidora del factor α de necrosis tumoral), tales como TAPI (Immunex Corp.) y GW-3333X (Glaxo Wellcome Inc.). También son adecuadas las moléculas que inhiben la formación del complejo IgA- α AT, tal como los péptidos divulgados en el documento EP 0 614 464 B, o anticuerpos contra este complejo. Moléculas adicionalmente adecuadas incluyen, entre otros, disacáridos inhibidores del TNF α , derivados sulfatados de glucosamina, u otros hidratos de carbono similares descritos en la patente de EE.UU. nº 6.020.323. Otras moléculas adecuadas incluyen inhibidores peptídicos del TNF α en las patentes de EE.UU. nº 5.641.751 y 5.519.000, y los péptidos que contienen D-aminoácidos descritos en la patente de EE.UU. nº 5.753.628. Además, los inhibidores de la enzima convertidora de TNF α también son adecuados. El documento WO 01/03719 describe otros agentes adicionales que se pueden usar en combinación de acuerdo con la invención.

50 60 Otros compuestos adecuados más incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, tales como talidomida o análogos de

la talidomida, pentoxtifilina o inhibidores de la matriz metaloproteína (MMP) u otras moléculas pequeñas. Inhibidores de MMP adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, los descritos en las patentes de EE.UU. nº 5.883.131, 5.863.949 y 5.861.510, así como compuestos mercaptoalquilpeptidilo, tal como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.872.146. Otras moléculas pequeñas capaces de reducir la producción de TNF α incluyen, por ejemplo, las moléculas descritas en las patentes de EE.UU. nº 5.508.300, 5.596.013 y 5.563.143. Moléculas pequeñas adicionales adecuadas incluyen, entre otras, inhibidores de MMP tal como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.747.514 y 5.691.382, así como derivados de ácido, tales como los descritos en la patente de EE.UU. nº 5.821.262. Otras moléculas adecuadas incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas que inhiben la fosfodiesterasa IV y la producción de TNF α , tal como derivados de oxima sustituidos (documento WO 96/00215), quinolina sulfonamidas (patente de EE.UU. nº 5.834.485), derivados de arilfurano (documento WO 99/18095) y derivados heterobicílicos (documentos WO 96/01825; GB 2 291 422 A). También son útiles los derivados de tiazol que suprimen el TNF α y el IFN. (documento WO 99/15524), así como los derivados de xantina que suprimen el TNF α y otras citoquinas proinflamatorias (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.118.500, 5.096.906 y 5.196.430). Moléculas pequeñas adicionales útiles para tratar las afecciones descritas en el presente documento incluyen las divulgadas en la patente de EE.UU. nº 5.547.979.

Otros ejemplos de fármacos y tipos de fármacos que se pueden administrar mediante terapia de combinación incluyen, entre otros, antivirales, antibióticos, analgésicos (p. ej., acetaminofen, codeína, napsilato de propoxifeno, clorhidrato de oxicodona, bitartrato de hidrocodona, tramadol), corticosteroides, antagonistas de citoquinas inflamatorias, fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (DMARD), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y fármacos antirreumáticos de acción lenta (SAARD).

Ejemplos de fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (DMARD) incluyen, entre otros: RheumatrexTM (metotrexato); Enbrel[®] (etanercept); Remicade[®] (infliximab); HumiraTM (adalimumab); Segard[®] (afelimomab); AravaTM (leflunomida); KinereTM (anakinra); AravaTM (leflunomida); D-penicilamina; Myochrysine; Plaquenil; RidauraTM (auranofin); Solganal; Ilencept (Hoffman-La Roche); CDP870 (Celltech); CDP571 (Celltech), así como los anticuerpos descritos en el documento EP 0 516 785 B1, patente de EE.UU. nº 5,656,272, documento EP 0 492 448 A1; onercept (Serono; nº reg. CAS 199685-57-9); MRA (Chugai); ImuranTM (azatioprina); inhibidores de NFkB; CytosanTM (ciclofosfamida); ciclosporina; sulfato de hidroxicloroquina; minociclina; sulfasalazina; y compuestos de oro, tales como oro oral, tiomalato sódico de oro y aurotioglucosa.

Otras moléculas adecuadas incluyen, por ejemplo, TNFR solubles, derivadas de las regiones extracelulares de las moléculas receptoras de TNF α distintas a los TNFR p55 y p75, tales como, por ejemplo, el TNFR descrito en el documento WO 99/04001, incluidos TNFR-Ig derivados de este TNFR. Inhibidores de TNF α adecuados adicionales son adecuados para usar como se ha descrito en el presente documento. Estos incluyen el uso de, no solo un anticuerpo contra TNF α o TNFR como se ha descrito en el presente documento, sino también un péptido derivado de TNF α que puede actuar como inhibidor competitivo de TNF α (como los descritos en la patente de EE.UU. 5,795,859 o la patente de EE.UU. 6.107.273), proteínas de fusión TNFR-IgG, tal como una que contiene la porción extracelular del receptor de p55 TNF α , un TNFR soluble distinto a la proteína de fusión de IgG, u otras moléculas que reducen los niveles de TNF α endógenos, tales como inhibidores de la enzima convertidora de TNF α (véase, por ejemplo el documento U.S. 5.594.106), o moléculas pequeñas o inhibidores de TNF α , una serie de los cuales se describe en el presente documento.

Con respecto a los anticuerpos frente al TNF, aunque un profesional sanitario experto determinará la dosis óptima de acuerdo con las necesidades específicas del paciente, un ejemplo de intervalo de dosis preferida para un anticuerpo contra TNF α es de 0,1 a 20 mg/kg, y, más preferentemente es 1-10 mg/kg. Otro intervalo de dosis preferida para un anticuerpo contra TNF α es de 0,75 a 7,5 mg/kg de peso corporal.

La presente invención también puede usar un agente de unión específica y cualquiera de uno o más de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los AINE deben su acción antiinflamatoria, al menos en parte, a la inhibición de síntesis de prostaglandinas. Goodman y Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, MacMillan 7th Edición (1985). Los AINE se puede caracterizar en nueve grupos. (1) derivados de ácido salicílico; (2) derivados de ácido propiónico; (3) derivados de ácido acético; (4) derivados de ácido fenámico; (5) derivados de ácido carboxílico; (6) derivados de ácido butírico; (7) oxicams; (8) pirazoles y (9) pirazolonas. Ejemplos de AINE incluyen, entre otros: AnaproxTM, Anaprox DSTM (naproxeno sódico); AnsaidTM (flurbiprofeno); ArthrotecTM (diclofenaco sódico + misoprostol); CataflamTM/VoltarenTM (diclofenaco potásico); ClinorilTM (sulindac); DayproTM (oxaprozim); DisalcidTM (salsalato); DolobidTM (diflunisal); EC NaprosynTM (naproxeno sódico); FeldeneTM (piroxicam); IndocinTM, Indocin SRTM (indometacina); LodineTM, Lodine XLTM (etodolac); MotrinTM (ibuprofeno); NaprelanTM (naproxeno); NaprosynTM (naproxeno); OrudisTM, (ketoprofeno); OruvailTM (ketoprofeno); RelafenTM (nabumetona); TolectinTM, (tolmetin sódico); TrilisateTM (trisalicilato de colina magnesio); inhibidores de la Cox-1; inhibidores de la Cox-2 tales como VioxTM (rofecoxib); ArcoxiaTM (etoricoxib); CelebrexTM (celecoxib); MobicTM (meloxicam); BextraTM (valdecoxib); DynastatTM paracoxib sódico; PrexigeTM (lumiracoxib) y nambumetona. AINE adicionales incluyen, entre otros, los siguientes: Ácido e-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxibutírico, amixetrina, anitrazafen, antrafenina, bendazac, bendazac lisinato, bencidamina, beprozina, broperanol, bucolome, bufezolac, ciproquazona, cloximato, dazidamina, deboxamet, detomidina, difenpiramida, difenpiramida, difisalamina, ditazol, emorfazona, mesilato de fanetizol, fenflumizol, floctafenina, flumizol, flunixin, fluproquazona, fopirtolina, fosfosal, guaimesal, guaiazolena, isonixirn, lefetamina HCl, leflunomida, lofemizol, lotifazol, clonixinato de lisina,

mesoclazona, nabumetona, nictindol, nimesulida, orgoteína, orpanoxina, oxaceprolm, oxapadol, paranilina, perisoxal, perisoxal citrato, pifoxima, piproxen, pirazolac, pirfenidona, proquazona, proxazol, thielavin B, tiflamizol, timegadina, tolectina, tolpadol, triptamida y los designados con el código numérico de la empresa, tales como 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, 5 FK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (4-benzoyl-1-indancarboxylic acid), TVX2706, U60257, UR2301 y WY41770. Los AINE relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares a los AINE también entran dentro de este grupo.

10 SAARD o DMARDS adecuados incluyen, entre otros: allocupreida sódica, auranofin, aurotioglucosa, aurotioglicanida, azatioprina, brequinar sódica, bucilamina, 3-auroto-2-propanol-1-sulfonato de calcio, clorambucilo, cloroquina, clobuzarit, cuproxolina, ciclofamida, ciclosporina, dapsona, 15-desoxispergualina, diacereína, glucosamina, sales de oro (p.ej., sal de oro cicloquinat, tiomalato sódico de oro, tiosulfato sódico de oro), hidroxicloroquina, hidroxiurea, kebuzona, levamisol, lobenzarit, melitina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mizoribina, 15 micofenolato mofetilo, mioral, mostaza de nitrógeno, D-penicilamina, piridinol imidazoles tales como SKNF86002 y SB203580, rapamiicina, tioles, timopoyetina y vincristina. SAARD o DMARD relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo.

20 Los inhibidores de las quinasas en las cascadas de señalización también son agentes adecuados para la combinación con los agentes de unión específicos de la invención. Estos incluyen, entre otros, agentes que son capaces de inhibir P-38 (a.k.a., "RK" o "SAPK-2", Lee y col., *Nature*, 372:739 (1994). P-38 se describe como una serina/treonina quinasa (véase Han y col., *Biochimica Biophysica Acta*, 1265:224-227 (1995). Se ha demostrado que los inhibidores de P38 intervienen entre el estímulo extracelular y la secreción de IL-1 y TNF α de la célula implica bloquear la transducción de la señal mediante la inhibición de una quinasa que reside en la vía de la señal.

25 También adecuados son los inhibidores de MK2 e inhibidores de tpl-2. Adicionalmente, los inhibidores de las células T también son adecuados, incluidos, por ejemplo, cta-4, CsA, Fk-506, OX40, OX40R-Fc, anticuerpo OX40, ligando OX40, anticuerpo ligando OX40, Ick, y ZAP70. También son adecuados los retinoides, incluidos retinoides orales, así como antagonistas de TGF- β .

30 Otros agentes adecuados para combinación con los agentes de unión específica de la invención incluyen, por ejemplo, cualquiera de uno o más derivados de ácido salicílico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dichos derivados de ácido salicílico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: acetaminosalol, alopiprin, aspirina, benorilate, bromosaligenina, acetilsalicilato cálcico, trisalicilato de colina magnesio diflusinal, etersalato, fendosal, ácido gentísico, glicolsalicilato, imidazolsalicilato, acetilsalicilato de lisina, mesalamina, salicilato de morfolina, salicilato de 1-naftilo, olsalazina, parsalmida, acetilsalicilato de fenilo, salicilato de fenilo, salacetamida, ácido salicilamida O-acético, salsalato y sulfasalazina. Derivados de ácido salicílico relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo. Agentes adecuados adicionales incluyen, por ejemplo, derivados de ácido propiónico, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido propiónico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, dexindoprofeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, furcloprofeno, ibuprofeno, ibuprofeno aluminio, ibuprofeno, indoprofeno, 40 isoprofeno, ketoprofeno, loxoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozina, piketoprofeno, pimeprofeno, pirprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico, piridoxiprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tioxaprofeno. Derivados de ácido propiónico relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo. También adecuados para usar son los derivados de ácido acético, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dichos derivados de ácido acético, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: acemetacina, alclofenaco, amfenaco, bufexamaco, cinmetacina, clopirac, delmetacina, diclofenaco sódico, etodolac, felbinac, fenclofenaco, fencloxac, ácido fenclóxico, fentiazac, furofenaco, glucometacina, ibufenaco, indometacina, isofezolac, isoxepac, ionazolac, ácido metiazínico, oxametacina, oxipinac, pimetacina, proglumetacina, sulindac, talmetacina, tiaramida, tiopinac, tolmetin, zidometacina y zomepirac. Derivados de ácido acético relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo. También adecuados para usar como se ha descrito en el presente documento son los derivados de ácido fenámico, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dichos derivados de ácido fenámico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: ácido enfenámico, etofenamato, ácido flufenámico, isonixina, ácido meclofenámico, meclofenamato sódico, ácido medofenámico, ácido mefanámico, 50 ácido niflúmico, talniflumato, terofenamato, ácido tolfenámico y ufenamato. Derivados de ácido fenámico relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo.

55 También son adecuados los derivados de ácido carboxílico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que se pueden usar comprenden: clidanaco, diflunisal, flufenisal, inoridina, ketorolaco y tinoridina. Derivados de ácido carboxílico relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo. Adicionalmente adecuados son los derivados de ácido butírico, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dichos derivados de

ácido butírico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: bumadizón, butibufenol, fenbufeno y xenbucina. Derivados de ácido butírico relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo. También son adecuados los oxicam, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los oxicam, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam y 4-hidroxil-1,2-benzotiazina 1,1-dióxido de 4-(N-fenil)-carboxamida. Derivados de oxicam relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo. También son adecuados los pirazoles, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los pirazoles, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que se pueden usar comprenden: difenamizol y epirizol. Derivados de pirazoles relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo. Además, son adecuados las pirazonas, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las pirazonas, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que se pueden usar comprenden: apazona, azapropazona, benzpipérilon, feprazona, mofebutazona, morazona, oxifenbutazona, fenilbutazona, pipebuzona, propilfenazona, ramifenazona, suxibuzona y tiazolinobutazona. Pirazonas relacionadas estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo.

También son adecuados los ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF. Corticosteroides, esteroides de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen hidrocortisona y compuestos que son derivados de hidrocortisona, tales como 21-acetoxi-pregnolona, alclomerasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, betametasona valerato, budesónida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasol propionato, clobetasona, clobetasona butirato, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacón, desonida, desoximerasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucoronida, flumetasona, flumetasona pivalato, flunisolida, flucinolona acetónida, fluocinonida, fluorocinolona acetónida, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortolona hexanoato, diflucortolona valerato, fluorometolona, fluperolona acetato, fluprednidén acetato, fluprednisolona, flurandenoída, formocortol, halcinonida, halometasona, halopredona acetato, hidrocortamato, hidrocortisona, hidrocortisona acetato, hidrocortisona butirato, hidrocortisona fosfato, hidrocortisona 21-sódico succinato, hidrocortisona tebutato, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednicolona, mometasona furoato, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisolona 21-diedriaminoacetato, prednisolona sódico fosfato, prednisolona sódico succinato, prednisolona sódico 21-m-sulfobenzoato, prednisolona sódico 21-estearoglicolato, prednisolona tebutato, prednisolona 21-trimetilacetato, prednisona, prednival, prednilideno, prednilideno 21-dietilaminoacetato, tixocortol, triamcinolona, triamcinolona acetónida, triamcinolona benetónida y triamcinolona hexacetónido. Corticosteroides relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo.

También son adecuados para uso en combinación tal como se describe en el presente documento antimicrobianos – (y ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos). Antimicrobianos adecuados incluyen, por ejemplo, ampicilina, amoxicilina, aureomicina, bacitracina, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, cefaclor, cefalexina, cefradina, ciprofloxacino, ácido clavulánico, cloxacilina, dicloxacilina, eritromicina, flucloxacilina, gentamicina, gramicidina, meticilina, neomicina, oxacilina, penicilina y vancomicina. Antimicrobianos relacionados estructuralmente que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también entran dentro de este grupo.

Compuestos adecuados adicionales incluyen, entre otros: BN 50730; tenidap; E 5531; tiapafant PCA 4248; nimesulida; panavir, rolipram; RP 73401; péptido T; MDL 201,449A; (1R,3S)-Cis-1-[9-(2,6-diaminopurinil)]-3-hidroxi-4-ciclopenteno clorhidrato; (1R,3R)-trans-1-[9-(2,6-diamino)purina]-3-acetoxiciclopentano; (1R,3R)-trans-1-[9-adenil]-3-azidociclopentano clorhidrato y (1R,3R)-trans-1-[6-hidroxi-puzin-9-il]-3-azido ciclopentano.

Se ha descubierto que la IL-4 puede inducir un efecto inflamatorio en algunos casos, tal como en el asma. En el que la sobreexpresión de IL-4 en los pulmones produce hipertrofia de células epiteliales y una acumulación de linfocitos, eosinófilos y neutrófilos. Esta respuesta es representativa de las principales características de la respuesta proinflamatoria inducida por otras citoquinas Th2. Por tanto, como se ha indicado anteriormente, los inhibidores de la IL-4 también son útiles de acuerdo con la invención. Adicionalmente, se apreciará que también se pueden usar ciertos inmunosupresores en el tratamiento de artritis, incluidos, entre otros, inhibidores de iNOS e inhibidores de 5-lipoxigenasa.

Se ha demostrado que el jengibre tiene ciertas propiedades antiinflamatorias y, por tanto, es adecuado para usar como agente antiinflamatorio de acuerdo con la invención, como es la condroitina.

Los listados anteriores se proporcionan a modo de ejemplo únicamente y no impiden el uso de otros compuestos o tratamientos que se pueden usar de forma concurrente con los compuestos descritos en el presente documento conocidos por los expertos en la técnica o a los que los expertos en la técnica podrían llegar usando las directrices indicadas en esta memoria descriptiva.

5 En general, los agentes Inmunoterapéuticos dependen del uso de las células efectoras inmunitarias y moléculas para dirigir y destruir las células cancerosas. Los efectores inmunitarios pueden ser, por ejemplo, un pepticuerpo de la presente invención que reconoce algún marcador sobre la superficie de una célula diana. El pepticuerpo solo puede servir como un efecto de terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente la destrucción de las células. El pepticuerpo también puede estar conjugado con un fármaco o toxina (agente quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina de la tosferina, etc.) y, de este modo, puede servir simplemente como agente dirigido.

10 De acuerdo con la presente invención, se pueden dirigir formas mutantes de Ang-2 mediante inmunoterapia con pepticuerpos o con conjugados de pepticuerpo de la invención. Particularmente se contempla que las 15 composiciones de pepticuerpo de la invención se pueden usar en un enfoque terapéutico combinado junto con la terapia dirigida a Ang-2.

Se ha demostrado que la inmunoterapia es particularmente eficaz contra una serie de cánceres. Véase, por ejemplo, el documento WO 98/39027.

15 Con los siguientes ejemplos se pretende únicamente ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ningún modo.

Ejemplo 1

Expresión de Ang-2 en tejido patológico y normal

20 La expresión de Ang-2 se analizó en tejido normal y patológico usando hibridación *in situ*. Fragmentos de las secuencias de Ang-2 humana (Número de acceso en Genbank: AF004327, nucleótidos 1274-1726) y murina (Número de acceso en Genbank: AF004326, nucleótidos 1135-1588) se amplificaron mediante PCR-transcriptasa inversa de ADNc de pulmón fetal humano o murino, clonadas en el plásmido pGEM-T verificadas mediante secuenciación. Sondas de ARN antisentido marcadas con ³³P se transcribieron a partir de moldes de plámidos linealizados usando ³³P-UTP y ARN polimerasa. Bloques de tejidos incluidos en parafina fijados con formaldehído se seccionaron a 5 µm y se colocaron sobre portaobjetos cargados. Antes de la hibridación *in situ*, los tejidos se 25 permeabilizaron con HCl 0,2M, seguido de la digestión con Proteinasa K, y acetilación con trietanolamina y anhídrido acético. Las secciones se hibridaron con la sonda marcada radioactivamente durante la noche a 55°C, después se sometieron a digestión con ARNasa y a un lavado en condiciones de alta rigurosidad en aproximadamente 0,1 X 30 SSC a 55°C. Los portaobjetos se sumergieron en emulsión Kodak NTB2, se expusieron a 4 °C durante 2-3 semanas, se desarrollaron y se sometieron a contratinación. Las secciones se analizaron con campo oscuro e iluminación estándar para permitir la evaluación simultánea de la morfología de tejidos y señal de hibridación.

35 Los resultados indicaban que la expresión de Ang-2 normal postnatal estaba restringida a los pocos tejidos que contienen vasculatura angiogénica, tales como ovarios, placenta, y útero. No se detectó expresión de Ang-2 en corazón, cerebro, riñón, hígado, pulmón, páncreas, bazo, músculo, amígdala, timo, apéndice, ganglio linfático, vesícula biliar, próstata o testículos humanos adultos. En ratones de cinco meses de edad (pero no en monos o seres humanos adultos) los riñones mostraron una expresión prominente de Ang-2 en el vasa recta (vasos rectos). Para determinar si esta expresión era un remanente del desarrollo embrionario, este experimento se repitió sobre 40 riñones derivados de ratones de edades variables hasta un año, usando la sonda de Ang-2 murina y las condiciones descritas anteriormente. Se observó que la expresión de Ang-2 disminuía durante el desarrollo neonatal, pero era todavía más evidente en los riñones de los ratones de un año de edad.

45 También se detectó expresión de Ang-2 en virtualmente todos los tipos de tumor analizados, incluidos tumores humanos primarios tales como carcinoma de colon (5 casos), carcinoma de mama (10 casos), carcinoma de pulmón (8 casos), glioblastoma (1 caso), tumores metastásicos humanos tales como carcinoma de mama (2 casos), carcinoma de pulmón (2 casos) y carcinoma de ovarios (2 casos) que se han metastatizado en el cerebro, y modelos de tumores de roedores tales como C6 (glioma de rata), HT29 (carcinoma de colon humano), Colo-205 (carcinoma de colon humano), HCT116 (carcinoma de colon humano), A431 (carcinoma epidermoide humano), A673 (rhabdomiosarcoma humano), HT1080 (fibrosarcoma humano), PC-3 (carcinoma de próstata humano), B16F 10 (melanoma murino), MethA (sarcoma murino) y carcinoma de pulmón de Lewis. Adicionalmente, se detectó expresión de Ang-2 se detectó en vasos nuevos que crecen en un tapón de Matrigel plug en respuesta a VEGF y en un modelo de hipoxia en ratón de retinopatía de premadurez.

50 Ejemplo 2

Ensayos moleculares para evaluar pepticuerpos de Ang-2

Se desarrollaron ensayos moleculares (ELISA de afinidad, ELISA de neutralización y BIAcore) para evaluar la unión directa de pepticuerpo a Ang-2 y miembros de la familia relacionados, y el efecto de los pepticuerpos sobre la interacción de Ang-2:Tie-2. Estos ensayos *in vitro* se describen como sigue.

55 ELISA de afinidad

Para la selección inicial de pepticuerpos candidatos a anti-Ang-2, se usaron Ang-2 purificada humana (R&D

Systems, Inc; número de catálogo 623- AN; Ang-2 se proporciona en forma de una mezcla de 2 versiones truncadas) o polipéptido de Ang-2 murino (preparado como se ha descrito anteriormente). Para los ensayos de unión confirmatorios, se obtuvo Ang-2 humana a partir de medios acondicionados de células 293T humanas transfeccionadas con ADN de Ang-2 de longitud completa y se cultivaron en medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) sin suero que contiene aproximadamente 50 microgramos por ml de albúmina sérica bovina (BSA).

Usando placas de microtitulación, a cada pocillo se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de ANg-2 y las placas se incubaron durante aproximadamente 2 horas, después de lo cual las placas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20 cuatro veces.

Después, los pocillos se bloquearon usando aproximadamente 250 microlitros por pocillo de aproximadamente 5 por ciento de BSA en PBS, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Después de la incubación, se descartó el exceso de la solución de bloqueo y aproximadamente 100 microlitros de cada candidato de pepticuerpo anti- Ang-2 se añadió a un pocillo en una serie de diluciones que comienzan a una concentración de aproximadamente 40 nanomolar y, después, se diluyeron en serie 4 veces en PBS que contenía aproximadamente 1 por ciento de BSA. Despues, las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente.

Después de la incubación, las placas se lavaron con PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Se repitieron los lavados cuatro veces adicionales, después de lo cual se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG(Fc)-HRP anti-humana de cabra (Pierce Chemical Co., nº de catálogo 31416) previamente diluida 1:5000 en PBS que contenía 1 por ciento BSA. Las placas se incubaron durante

aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Despues, las placas se lavaron cinco veces en PBS que contenía 0,1 por ciento de Tween-20, después de lo cual se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina Liquid Substrate System; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, número de catálogo T8665) y las placas se incubaron aproximadamente 5 - 15 minutos hasta que se desarrolló el color azul. Despues se leyó la absorbancia a aproximadamente 370 nm en un espectrofotómetro.

ELISA de neutralización

Las placas de microtitulación a las que se ha unido el polipéptido de Ang-2 humana se prepararon como se ha descrito para el ELISA de afinidad. Los pepticuerpos candidatos de anti-Ang-2 se titularon desde 1000 nM a 0,2 pM en diluciones 4 veces en una solución de PBS que contiene aproximadamente 1% de BSA y aproximadamente Tie-2 1 nM (suministrado en forma de molécula Tie-2-Fc, en la que la parte Tie-2 contiene solamente la porción extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Despues a cada pocillo se añadió aproximadamente 100 microlitros de la solución del anticuerpo/Tie -2, las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y, después, se lavaron cinco veces en PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Despues de lavar, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de anticuerpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., nº de catálogo 557039) hasta una concentración final de aproximadamente 1 microgramo por ml, y las placas se incubaron durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG anti-ratón de cabra-HRP (Pierce Chemical CO., nº de catálogo 31432) a una dilución de 1:10.000 en PBS que contiene aproximadamente 1 por ciento de BSA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, después de lo cual se lavaron cinco veces con PBS que contiene aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Despues, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato TMB (descrito anteriormente) y se dejó que se desarrollara el color. Despues se leyó la absorbancia a aproximadamente 370 nm en un espectrofotómetro.

BIAcore de afinidad

Se realizó un análisis de afinidad de cada pepticuerpo de Ang-2 candidato sobre una BIAcore®2000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) con PBS y 0,005 por ciento de tensioactivo P20 (Biacore, Inc.) como tampón de desarrollo. La proteína G recombinante (Repligen, Needham, MA) se inmovilizó en un circuito sensor CM5 de calidad de investigación (Biacore, Inc.) mediante grupos amina primarios usando el kit de acoplamiento de aminas (Biacore, Inc.) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante.

Se llevaron a cabo ensayos de unión, primero capturando aproximadamente 100 Ru de cada pepticuerpo anti-Ang-2 candidato a la proteína G inmovilizada, después de los cual se inyectaron diversas concentraciones (0 – 100 nM) de huAng-2 o mAng-2 sobre la superficie del anticuerpo unido a un caudal de 50 μ l/min durante 3 minutos. Se determinaron los parámetros cinéticos de unión a pepticuerpo incluyendo la k_a (constante de velocidad de asociación), k_d (constante de velocidad de disociación) y K_D (constante de equilibrio de disociación) usando el programa de ordenador BIA evaluation 3.1 (Biacore, Inc.). Las constantes de equilibrio de disociación menores indicaron mayor afinidad del pepticuerpo por Ang-2.

Ejemplo 3

55 Identificación de péptidos de unión a Ang-2

1. Preparación de perlas magnéticas recubiertas con Ang-2

A. Inmovilización de Ang-2 sobre perlas magnéticas

Para la elución no específica, la proteína biotinilada Ang-2 (Angiopoyetina-2 humana recombinante biotinilada, R&D Systems, Inc.; número de catálogo BT 623) se inmovilizó sobre perlas Streptavidin Dynabeads (Dynal, Lake Success, NY) a una concentración de aproximadamente 4 µg de la proteína Ang-2 biotinilada por 100 µl de la reserva de perlas del fabricante para las tres rondas de selección. Para las eluciones de antígeno (Ang-2) y receptor (Tie-2), 2 µg de proteína Ang-2 biotinilada se inmovilizaron sobre 50 µl de las Streptavidin Dynabeads para las segundas rondas de selección. Se redujo la concentración de recubrimiento hasta aproximadamente 1 µg de proteína Ang-2 biotinilada por 50 µl de la reserva de perlas para la tercera ronda de selección. Sacando las perlas a un lado de un tubo usando un imán y retirando por pipeteo el líquido, las perlas se lavaron cinco veces con la solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se volvieron a suspender en PBS. La proteína Ang-2 biotinilada se añadió a las perlas lavadas a la concentración anterior y se incubó con rotación durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una incubación de unas horas a una noche a 4 °C con rotación. Las perlas recubiertas con Ang-2 se bloquearon mediante la adición de BSA hasta aproximadamente 1% de concentración final e incubación durante la noche a 4°C con rotación. Las perlas recubiertas con Ang-2 resultantes se lavaron después cinco veces con PBS antes de someterse a los procedimientos de selección.

15 B. Preparación de perlas de selección negativa

También se prepararon perlas adicionales para las selecciones negativas. Para cada condición de *panning*, 500 µl de la reserva de perlas del fabricante se sometieron al procedimiento anterior (sección 1A), excepto que se omitió la etapa de incubación con Ang-2 biotinilada. En la última etapa de lavado, las perlas se dividieron en cinco alícuotas de 100 µl.

20 2. Selección de fago de unión a Ang-2

A. Estrategia global

Tres genotecas de fago filamentoso, denominados "TN8-IX" (5×10^9 transformantes independientes), "TN12-1" (1,4 x 10^9 transformantes independientes), y "Lineal" ($2,3 \times 10^9$ transformantes independientes) (todos de Dyax Corp.) se usaron para seleccionar el fago de unión a Ang-2. Después cada genoteca se sometió a bien elución no específica, elución de Ang-2 y elución del receptor (Tie-2). Se llevaron a cabo nueve diferentes condiciones de *panning* para Ang-2 (TN8-IX usando el procedimiento de elución no específico, TN8-IX usando el procedimiento de elución de Ang-2, TN8-IX usando el procedimiento de elución de Tie-2, TN12-1 usando el procedimiento de elución no específico, TN12-1 usando el procedimiento de elución de Ang-2, y TN12-1 usando el procedimiento de elución de Tie-2, Lineal usando el procedimiento de elución no específico de Ang-2, y Lineal usando el procedimiento de elución de Tie-2). Para las tres genotecas, el fago de la primera ronda de selección se eluyó solamente de una manera no específica para las posteriores rondas de selección. Las eluciones de Ang-2 y Tie-2 se usaron en la segunda y tercera rondas de selección. Para la genoteca Lineal, la selección se llevó a cabo hasta solamente la segunda ronda para las eluciones de Ang-2 y Tie-2.

B. Selección negativa

35 Para cada condición de *panning*, aproximadamente 100 genotecas aleatorias equivalentes para las genotecas TN8-IX y TN12-1 (aproximadamente 5×10^{11} ufp para TN8-IX, y aproximadamente $1,4 \times 10^{11}$ ufp para TN12-1) y aproximadamente 10 genotecas aleatorias equivalentes para la genoteca lineal (aproximadamente 1×10^{11} 1 ufp) se tomaron muestras alícuotas de la reserva de genotecas y se diluyeron aproximadamente 400 µl con PBST (PBS con 0,05% de Tween-20). Después del ultimo lavado, se extrajo el líquido de la primera alícuota de 100 µl de las perlas preparadas para la selección negativa (sección 1 B), los aproximadamente 400 µl de genoteca diluida se añadieron a las perlas. La mezcla resultante se incubó durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente con rotación. El sobrenadante del fago se extrajo usando el imán y se añadió a la segunda alícuota de 100 µl para otra etapa de selección negativa. De esta forma, se realizaron cinco etapas de selección negativa.

C. Selección usando las perlas recubiertas con proteína Ang-2

45 El sobrenadante de fago, después la última etapa de selección negativa (sección 1 B,) se añadió a las perlas recubiertas con Ang-2 (sección 1 A). Esta mezcla se incubó con rotación durante una a dos horas a temperatura ambiente, permitiendo que el fago se uniera a la proteína diana. Después de desechar el sobrenadante, las perlas se lavaron aproximadamente diez veces con PBST, seguido de dos lavados con PBS.

D. Elución no específica

50 Después del lavado final, se extrajo el líquido (sección 2C), se añadió aproximadamente 1 ml de solución de sales Min A (K_2HPO_4 60 mM, KH_2PO_4 33 mM, $(NH_4)SO_4$ 7,6 mM y citrato sódico 1,7 mM) a las perlas. Esta mezcla de perlas se añadió directamente a una muestra de bacterias concentrada para infección (véase más adelante las secciones 3A y 3B).

E. Elución del antígeno (Ang-2) del fago unido

55 Para la ronda 2, después de la última etapa de lavado (sección 2C), el fago unido se eluyó de las perlas magnéticas mediante la adición de 100 µl de 1 pM, 0,1 nM, y 10 nM de proteína recombinante Ang-2 (angiopoyetina-2 humana

recombinante, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) sucesivamente con una incubación de 30 minutos para cada condición. El fago restante se eluyó de forma no específica (sección 2D). Se combinaron el fago eluido de 10 nM y las eluciones no específicas y se sometieron a la tercera ronda de selección (véase la Sección 4, más adelante).

- 5 Para la ronda 3, después de la última etapa de lavado (sección 2C), el fago unido se eluyó de las perlas magnéticas mediante la adición de aproximadamente 1 nM de proteína Ang-2 recombinante y 10 nM de proteína Ang-2 recombinante sucesivamente con una incubación de 30 minutos para cada condición. Además, el fago se eluyó con 1 ml de solución de trietilamina 100 mM (Sigma, St. Louis, Missouri) durante aproximadamente 10 minutos en un rotor El pH del fago que contiene la solución de trietilamina se neutralizó con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M (pH 7,5).
 10 Despues de la última elución con solución de trietilamina 100 mM, el fago restante se eluyó mediante la adición de perlas a las bacterias (sección 2D).

F. Elución del receptor (Tie-2) de fago unido

- 15 Para la ronda 2, después de la última etapa de lavado (sección 2C), el fago unido se eluyó de las perlas magnéticas mediante la adición de aproximadamente 100 μ l de proteína Tie-2 1 pM, 0,1 nM y 10 nM (quimera Tie2-Fc recombinante, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) sucesivamente con una incubación de 30 minutos para cada condición. El fago restante se eluyó de forma no específica (sección 2D). Se combinaron el fago eluido de 10 nM y las eluciones no específicas y se sometieron a la tercera ronda de selección (véase la Sección 4, más adelante).

- 20 Para la ronda 3, después de la última etapa de lavado (sección 2C), el fago unido se eluyó de las perlas magnéticas mediante la adición de aproximadamente 1 nM de proteína Ang-2 recombinante y 10 nM de proteína Tie-2 recombinante sucesivamente con una incubación de 30 minutos para cada condición. Además, el fago se eluyó con 1 ml de solución de trietilamina 100 mM (Sigma, St. Louis, Missouri) durante 10 minutos en un rotor El pH del fago que contiene la solución de trietilamina se neutralizó con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M (pH 7,5). Despues de la última elución con solución de trietilamina 100 mM, el fago restante se eluyó mediante la adición de perlas a las bacterias (sección 2D).

3. Amplificación

A. Preparación de células de siembra

- 30 Se hizo crecer cultivo nuevo de *E. coli*. (XL-1 Blue MRF') hasta una $DO_{600} = 0,5$ en medios LB que contenían aproximadamente 12,5 μ g/ml de tetraciclina. Para cada condición de cribado aproximadamente 20 ml de este cultivo se enfriaron en hielo y se centrifugaron. Se resuspendió el sedimento de bacterias en aproximadamente 1 ml de la disolución de sales min A.

B. Transducción

- 35 A una muestra concentrada de bacterias (sección 3A) se añadió cada mezcla de cada diferente procedimiento de elución indicado anteriormente (secciones 2D, 2E y 2F) y se incubó a 37°C durante aproximadamente 15 minutos. A cada mezcla Se añadieron aproximadamente 2 ml de medio NZCYM (2x NZCYM, 50 μ g/ml de ampicilina) y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Los 4 ml de solución resultante se sembraron en una placa grande de agar con NZCYM que contenía aproximadamente 50 μ g/ml de ampicilina y se incubó durante la noche a 37°C.

C. Recogida de Fagos

- 40 Cada mezcla de bacterias/fago se cultivó durante la noche en una placa grande de agar NZCYM (sección 3B), después de lo cual se retiraron por raspado en aproximadamente 35 ml de medio LB. La placa de agar se aclaró además con 35 ml adicionales de medio LB. La mezcla resultante de bacterias/fago en medio LB se centrifugó para que se separaran por sedimentación las bacterias. Aproximadamente 50 ml del sobrenadante del fago se transfirieron después a un tubo nuevo y aproximadamente 12,5 ml de solución de PEG (20% de PEG8000, acetato amónico 3,5 M) se añadió y se incubó en hielo durante 2 horas para precipitar el fago. El fago precipitado se centrifugó y se volvió a suspender en 6 ml de tampón de resuspensión de fago (NaCl (250 mM, Tris 100 mM, pH 8, EDTA 1 mM)). Esta solución de fago se purificó además mediante separación por centrifugación de las bacterias restantes y precipitación del fago por segunda vez mediante la adición de aproximadamente 1,5 ml de la solución de PEG. Despues de una etapa de centrifugación, el sedimento de fago se volvió a suspender en aproximadamente 400 μ l de PBS. Esta solución se sometió a una centrifugación final para retirar de a solución de cualquier desecho de bacterias restante. La preparación de fago resultante se tituló usando ensayos de formación de placas convencionales.

4. Selección y Amplificación adicional

- 55 En la segunda ronda, la preparación de fago amplificado (aproximadamente 10^{10} ufp) de la primera ronda (sección 3C) se usó como el fago de entrada para realizar las etapas de selección y amplificación (secciones 2 y 3). Para las eluciones de Ang-2 y Tie-2, las eluciones de fago 10 nM y no específicas se combinaron y se amplificaron para la tercera ronda de selección. La preparación de fago amplificado (aproximadamente 10^9 ufp) de la segunda ronda se

usó a su vez como el fago de entrada para realizar la 3^a ronda de selección y amplificación (secciones 2 y 3). Despues de las etapas de elución (secciones 2D, 2E, y 2F) de la tercera ronda, se sembró una pequeña fracción del fago eluido como el ensayo de formación de placas (sección 3C). Las placas individuales se escogieron y se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían 100 μ l de tampón TE en cada pocillo. Estas placas maestras se incubaron a 4 °C durante la noche para permitir que el fago se eluyera en el tampón de TE

5

5. Análisis clonal

Los clones de fago Se analizaron mediante ELISA de fago y secuenciación de ADN. Las secuencias se clasificaron basándose en los resultados combinados de estos dos ensayos.

A. ELISA del fago

10 Se desarrolló un cultivo de An XL-1 Blue MRF' hasta que la DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 0,5. Aproximadamente treinta μ l de este cultivo se depositaron en muestras alícuotas en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Aproximadamente 10 μ l del fago eluido (sección 4) se añadieron a cada pocillo y se dejó que infectaran las bacterias durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Aproximadamente 100 μ l de medio LB media que contenía aproximadamente 12,5 μ g/ml de tetraciclina y se añadieron aproximadamente 50 μ g/ml de ampicilina a cada pocillo. Despues, la placa de microtitulación se incubó con agitación durante toda la noche a aproximadamente 37°C. La Proteína Ang-2 recombinante (aproximadamente 1 μ g/ml en PBS) se dejó que se uniera a las placas Maxisorp de 96 pocillos (NUNC) durante la noche a aproximadamente 4°C. Como control, estreptavidina pura se revistió sobre una placa Maxisorp separada a aproximadamente 2 μ g/ml en PBS.

20 Al día siguiente, el líquido en las placas Maxisorp revestidas con proteína se desechó, y se bloqueó cada pocillo con aproximadamente 300 μ l de 5% de solución de leche a aproximadamente 4°C durante toda la noche (como alternativa, 1 hora a temperatura ambiente). Despues, se desechó la solución láctea y se lavaron los pocillos tres veces con la solución de PBST. Despues de la última etapa de lavado, se añadieron aproximadamente 50 μ l de PBST-4% de leche a cada pocillo de las placas Maxisorp revestidas con proteína. Aproximadamente 50 μ l de los cultivos de la noche de cada pocillo en la placa de microtitulación de 96 pocillos se transfirieron a los pocillos correspondientes de las placas revestidas con Ang-2 así como a las placas revestidas con estreptavidina control. La mezcla de 100 μ l en cada tipo de placa se incubó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Se desechó el líquido de las placas de Maxisorp y se lavaron los pocillos aproximadamente tres veces con PBST. El anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) se diluyó hasta aproximadamente 1:7,500, y aproximadamente 100 μ l de la solución diluida se añadió a cada pocillo de las placas Maxisorp durante aproximadamente 1 hora de incubación a temperatura ambiente. Se desechó el líquido de nuevo y se lavaron los pocillos aproximadamente cinco veces con PBST. Aproximadamente 100 μ l del sustrato TMB (Sigma) se añadieron despues a cada pocillo y se detuvo la reacción con aproximadamente 50 μ l de la solución H₂SO₄ 5N. La DO₄₅₀ se leyó sobre un espectrofotómetro (Molecular Devices).

25

30

B. Secuenciación de los clones de fago

35 Para cada clon de fago, se preparó el molde de secuenciación usando la PCR. Se usó el siguiente par de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de aproximadamente 500 nucleótidos:

Cebador 1: 5'-CGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTG-3' (SEC ID Nº 54)

Cebador 2: 5'-CATGTACCGTAACACTGAGTTCGTC-3' (SEC ID Nº 55)

40 Se preparó la siguiente mezcla para cada clon:

Reactivos	Volumen (μ l) / Tubo
dH ₂ O	26,25
50 % glicerol	10
10X tampon de PCR (sin MgCl ₂)	
MgCl ₂ 25 mM	5
Mezcla de dNTP 10 mM	4
100 μ M cebador 1	1
100 μ M cebador 2	0,25
Taq polimerasa	0,25
Fago en TE (Sección 4)	3
Volumen final de la reacción	50

5 Para la PCR, se usó un termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) para llevar a cabo el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos; (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 seg) x 30 ciclos; 72°C durante 7 minutos; enfriamiento hasta 4°C. El producto de PCR para cada reacción se purificó usando el kit de purificación QIAquick Multiwell PCR (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. El producto purificado de PCR se analizó después mediante el desarrollo de aproximadamente 10 µl de cada mezcla de reacción de PCR con aproximadamente 1 µl de pigmento (10 X BBXS de pigmento de carga de gel de agarosa) sobre un gel de agarosa al 1%. El producto restante se secuenció después usando el secuenciador ABI 377 (Perkin Elmer) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

10 6. Clasificación de secuencias y determinación de la secuencia consenso

A. Clasificación y análisis de secuencias

15 Las secuencias de péptidos que se tradujeron de secuencias de nucleótidos variables (sección 5B) se correlacionaron con los datos de ELISA. Los clones que mostraban una DO₄₅₀ alta en los pocillos revestidos con Ang-2 y una DO₄₅₀ baja en los pocillos revestidos con estreptavidina proporcionaron una clasificación de prioridad más elevada. A las secuencias que aparecieron múltiples veces también se les asignó una clasificación de prioridad alta. Las secuencias candidatas se eligieron basándose en estos criterios para análisis adicional de como péptidos o pepticuerpos.

B. Determinación de la secuencia consenso

Se generaron tres clases diferentes de motivos consenso a partir la genoteca de TN8-IX del siguiente modo:

20

KRPCEEXWGGCXYX (SEC ID Nº 56)

KRPCEEXFGGCXYX (SEC ID Nº 57)

XXXCXDXYWYCXXX (SEC ID Nº 61)

25 XXXCXDXTYCXXX (SEC ID Nº 62)

XXXCXDXFWYCXXX (SEC ID Nº 63)

XXXCXDXFTYCXXX (SEC ID Nº 64)

XXXCXWDPWTCEXM (SEC ID Nº 58)

Se generó un motivo consenso a partir de la genoteca TN12-I:

30 WSXCAWFXXXXCRRX (SEC ID Nº 59)

Para todas las secuencias motivo consenso, las "secuencias de aminoácidos centrales" subrayadas de cada secuencia consenso se obtuvieron mediante la determinación del aminoácido más frecuente en cada posición. "X" se refiere a cualquier aminoácido de origen natural. Las dos cisteínas adyacentes a las secuencias centrales eran aminoácidos fijos en las genotécas TN8-IX y TN12-I.

35 Los péptidos que se identificó que se unían a Ang-2 se exponen en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Péptidos de unión a Ang-2

Péptido	SEC ID Nº	Secuencia
TNF8-8	1	KRPCEEMWGGCNYD
TN8-14	2	HQICKWDPWTCKHW
TN8-Con1	3	KRPCEEIFGGCTYQ
TN8-Con4	4	QEECEWDPWTCEHM
TN12-9	5	FDYCEGVEDPFTFGCDNH
L1	6	KFNPLDEEETLYEQFTFQQ
C17	7	QYGCDGFLYGCIN

Ejemplo 4Construcción de ADN que codifica pepticuerpos

5 Los péptidos modificados seleccionados como potencialmente inhibidores de la unión de Ang-2:Tie-2 (véase la Tabla 3) se usaron para construir proteínas de fusión en las que o bien un monómero de cada péptido o un dímero tándem de cada péptido (con un enlazador entre las unidades monoméricas) se condensó en marco a ADN que codifica un enlazador seguido de la región de Fc de la IgG1 humana. Cada péptido modificado se construyó mediante pares de hibridación de oligonucleótidos ("oligos") para generar un polinucleótido dúplex que codifica el péptido junto con un enlazador comprendido, dependiendo del péptido, de o bien cinco residuos de glicina, ocho 10 residuos de glicina o un residuo de lisina; estas construcciones se generaron como fragmentos de NdeI a Xhol. Estas moléculas de polinucleótidos dúplex se ligaron en el vector (pAMG21 -Fc N-terminal, descrito adicionalmente más adelante) que contiene el gen de Fc humano, que se había digerido previamente con NdeI y Xhol. Las mezclas de ligamiento resultantes se transformaron mediante electroporación en las células de la cepa de *E. coli* 2596 (GM221, descritas además más adelante) usando procedimientos convencionales. Los clones se 15 seleccionaron por la capacidad de producir el producto de proteína recombinante y de poseer la fusión de gen que tiene una secuencia de nucleótidos correcta. Se seleccionó un único de estos clones para cada uno de los péptidos modificados (es decir, productos de fusión de Fc péptido).

Construcción del vector N-terminal de pAMG21 -FcpAMG21

20 El plásmido de expresión pAMG21 (nº ATCC 981 13) deriva del vector de expresión pCFM1656 (nº ATCC 69576) y el sistema del vector de expresión descrito en la patente de Estados Unidos No. 4.710.473, siguiendo el procedimiento descrito en la solicitud de patente internacional publicada WO 00124782 (véase la parte del Ejemplo 2 que se extiende desde las páginas 100 -103, así como las figuras 17A y 17B).

Vector N-terminal Fc

25 El vector de Fc N-terminal se creó usando la cepa de *E. coli* 3788, pAMG21 monómero de Tpo Gly5-Fc como molde. La información sobre la clonación de esta cepa se puede encontrar en el documento WO 00124782 (Véase el Ejemplo 2 y la figura 10 en el presente documento). Se diseñó un cebador 5' PCR (descrito además más adelante) para retirar la secuencia de péptidos de Tpo en pAMG Tpo Gly5 y se reemplazó con un polienlazador que contiene los sitios ApaI y Xhol. Usando la cepa 3788 como molde, se realizó la PCR con la Polimerasa de Larga Expansión, 30 usando los oligonucleótido de la SEC ID Nº 8, más adelante, como el cebador de 5' y un cebador 3' universal, SEC ID Nº 9, más adelante. El producto de PCR resultante se purificó en gel y se sometió a digestión con las enzimas de restricción NdeI y BsrGI. Tanto el plásmido como el polinucleótido que codifica el péptido de interés junto con su enlazador se purificaron en gel usando columnas de espín de purificación en gel Qiagen (Chatsworth, CA). El plásmido y el inserto se ligaron después usando procedimientos de ligamiento convencionales, y la mezcla de 35 ligamiento a resultante se transformó en células de *E. coli* (cepa 2596).

Se seleccionaron clones únicos y se realizó la secuenciación de ADN. Se identificó un clon correcto y éste se usó como una fuente de vector para los péptidos modificados descritos en el presente documento.

Cebador en 5':

ACAAACAAACATATGGGTGCACAGAAAGCGGCCGCAAAAAAA CTCGAGGGTGGAGGCCGTGGGGACA

40 (SEC ID Nº 8)

Cebador en 3':

GGTCATTACTGGACCGGATC (SEC ID Nº 9)

Además de la preparación de estos péptidos modificados como fusiones N-terminales a Fc (pepticuerpos N terminales), alguno de ellos también se prepararon como productos de fusión C-terminales (pepticuerpos C-terminales). El vector usado para preparar las fusiones C-terminales se describe más adelante.

Construcción del vector C-terminal de Fc

50 El vector C-terminal de Fc N péptidos modificados se creó usando la cepa de *E. coli* 3728, pAMG21 monómero de Tpo Gly5-Fc como molde. La información sobre la clonación de esta cepa se puede encontrar en el documento WO 0024782 (Véase el Ejemplo 2 y la figura 7 en el presente documento). Se diseñó un cebador en 3' para PCR (SEC ID Nº 10) para retirar la secuencia de péptidos de Tpo y para reemplazarla con un polienlazador que contiene los sitios ApaI y Xhol. Usando la cepa 3728 como molde, se realizó la PCR con la Polimerasa de Larga Expansión, usando un cebador universal en 5' (SEC ID Nº 11) y el cebador en 3' mencionado anteriormente. El producto de PCR resultante se purificó en gel y se sometió a digestión con las enzimas de restricción BsrGI y BamHI. Tanto el

plásmido como el polinucleótido que codifica cada péptido de interés con su enlazador se purificaron en gel usando columnas de espín de purificación en gel. El plásmido y el inserto se ligaron después usando procedimientos de ligamiento convencionales, y la mezcla de ligamiento a resultante se transformó en células de *E. coli* (cepa 2596). Se seleccionaron clones únicos y se realizó la secuenciación de ADN. Se identificó un clon correcto y se usó como una fuente de vector para los péptidos modificados descritos en el presente documento.

5

Cebador en 5':

CGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGG (SEC ID Nº 10)

Cebador en 3':

**TTTGTGGATCCATTACTCGAGTTTTGCGGCCGCTTCTGTG
CACCAACCACCTCCACCTTAC (SEQ ID NO: 11)**

10 GM221 (#2596). La cepa huésped nº 2596, usada para expresar las proteínas de fusión del péptido-Fc, es una cepa de *E. coli* K-12 modificada para contener el promotor lux, y tanto el represor lambda sensible a la temperatura c1857s7 en la región temprana *ebg* como el represor lacI_Q en la región tardía *ebg*. La presencia de estos dos genes represores permite el uso de este huésped con una variedad de sistemas de expresión la denominación de ATCC para esta cepa es 202174.

15 **Ejemplo 5**

Producción de pepticuerpos

20 Expresión en *E. coli*. Se hicieron crecer los cultivos de cada uno de las construcciones de fusión pAMG21-Fc a 37°C en medio Terrific Broth (véase Tartof y Hobbs, "Improved media for growing plasmid and cosmid clones", Bethesda Research Labs Focus, volumen 9, página 12, 1987, citado en la referencia de Sambrook y col mencionada anteriormente). Se logró la inducción de la expresión de producto génico a partir del promotor luxPR tras la adición 25 del autoinductor sintético, N-(3-oxohexanoil)-DL-homoserina lactona, al medio de cultivo hasta una concentración final de 20 nanogramos por mililitro (ng/ml). Los cultivos incubaron a 37 °C durante 6 horas adicionales. Después se analizaron los cultivos bacterianos mediante microscopía para determinar la presencia de cuerpos de inclusión y se recogieron mediante centrifugación. Se observaron cuerpos de inclusión refráctiles en los cultivos inducidos, lo que indicaba que muy probablemente las fusiones de Fc se producían en la fracción insoluble en *E. coli*. Se lisaron los 30 sedimentos celulares directamente mediante la resuspensión en tampón de muestra Laemmli que contenía β-mercaptopetanol al 10% y se analizaron mediante SDS-PAGE. En la mayoría de los casos, se observó una banda intensa teñida con coomassie del peso molecular apropiado en un gel SDS-PAGE.

35 Purificación. Las células Se rompieron en agua (1/10) usando homogeneización a alta presión (dos pasos a 14.000 PSI) y y se recogieron los cuerpos de inclusión mediante centrifugación (4000 RPM en centrífuga J-6B durante una hora). Los cuerpos de inclusión Se solubilizaron en guanidina 6 M, Tris 50 mM, DTT 8 mM, pH 8,5 durante 1 hora a una proporción 1/10. Para los péptidos lineales condensados a Fc, la mezcla solubilizada se diluyó veinticinco veces en urea 2 M, Tris 50 mM, arginina 160 mM, cisteína 2 mM, pH 8,5. Se dejó que la oxidación progresada durante dos días a 4°C, permitiendo la formación del compuesto unido a disulfuro (es decir, homodímero Fc-péptido). Para los 40 péptidos cíclicos condensados a Fc, se siguió este mismo protocolo además de las siguientes tres condiciones de plegamiento: (1) urea 2 M, Tris 50 mM, arginina 160 mM, cisteína 4 mM, cistamina 1mM, pH 8.5; (2) urea 4 M, glicerol al 20 %, Tris 50 mM, arginina 160 mM, cisteína 2 mM, pH 8.5; y (3) urea 4 M, glicerol al 20 %, Tris 50 mM, arginina 160 mM, cisteína 4 mM, cistamina 1mM, pH 8,5. La proteína replegada se dializó contra urea 1,5M, NaCl 50mM, Tris 50mM, pH 9,0. El pH del medio se se redujo hasta un pH de 5 con con ácido acético. Se retiró el 45 precipitado mediante centrifugación y el sobrenadante se ajustó hasta un pH de entre 5 y 6,5, dependiendo del punto isoelectrónico de cada producto de fusión. La proteína se filtró y se cargó a 4 °C en una columna de SP-Sefarosa HP equilibrada en NaAc 20 mM, NaCl 50 mM al pH determinado para cada construcción. La proteína se eluyó usando un gradiente lineal de volumen de 20 columnas en el mismo tampón que varía entre NaCl 50 mM y NaCl 500 mM. El pico se combinó y se filtró.

45 Los pepticuerpos generados usando los procedimientos anteriores se exponen en la Tabla 4 más adelante.

Tabla 4

Pepticuerpo	Secuencia del pepticuerpo
L1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEC ID Nº:12)
L1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEC ID Nº:13)
L1 (N) 1K WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGSATGGSGTASSGSGSA THLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 14)

Pepticuerpo	Secuencia del pepticuerpo
2xL1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGKFNPLDEL EETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEC ID N°:15)
2xL1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGKFNPLDELEETL YEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEC ID N°:16)
Con4 (N)	MGAQQEECEWDPWTCEHMLBGGGGG-Fc (SEC ID N°:17)
Con4 (N) 1K-WT	MQEECEWDPWTCEHMGSATGGSGSTASSGSGSAT GGGGG-Fc (SEC ID N°:18)
2xCon4 (N) 1K	MGAQQEECEWDPWTCEHMGSATGGSGSTASSGSGSAT HQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG~Fc (SEC ID N°: 19)
L1 (C)	M-Fc-GGGGAAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEC ID N°:20)
L1 (C) 1K	M-Fc GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSAT HFNPLDELEETL YEQFTFQQLE (SEC ID N°:21)
2xL1 (C)	M-Fc- GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEC ID N°:22)
Con4 (C)	M-Fc-GGGGAAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEC ID N°:23)
Con4 (C) 1K	M-Fc GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSAT HQUEECEWDPWT CEHMLE (SEC ID N°:24)
2xCon4 (C) 1K	M-Fc GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMGSATGGSGSTASSGSG SATHQUEECEWDPWTCEHMLE (SEC ID N°:25)
Con4-L1 (N)	MGAQEECEWDPWTCEHMGGGGGGKFNPLDELEETLY EQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGSGSAT HLEGGGG~c (SEC ID N°:26)
Con4-L1 (C)	M-Fc GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSAT HFNPLDELEETL YEQFTFQQGGGGQEBCEWDPWTCEHMLE (SEQ In NO:27)
TN-12-9 (N)	MGAQ-FDYCEGVEDPFTFGCDNHLE-GGGGG-Fc (SEC ID N°:28)
C17 (N)	MGAQ-QYGCDGFLYGCINLE-GGGGG-Fc (SEC ID N°:29)
TN8-8 (N)	MGAQ-KRPCEEMWGGCNYDLEGGGGG-Fc (SEC ID N°:30)
TN8-14 (N)	MGAQ-HQICKWDPWTCKHWLEGGGGG-Fc (SEC ID N°:31)
Con1 (N)	MGAQ-KRPCEEIFGGCTYQLEGGGGG-Fc (SEC ID N°:32)

En la Tabla 4, "Fc" se refiere a la secuencia de Fc IgG1. La columna dos expone la secuencia de aminoácidos del pepticuerpo. Su parte Fc está marcada "Fc", y se expone en la SEC ID N° 60, más adelante. Se apreciará que cuando se usa una marca, por ejemplo, "Con4" o "Con-4", ésta se refiere al péptido Con-4, mientras que el uso del sufijo "C", "(C)", o "-C"; o "N", "(N)", o "-N" inmediatamente después indica que la molécula es un pepticuerpo como se describe en el presente documento. Los sufijos "N", "(N)", o "-N" en un nombre de pepticuerpo indican que el péptido de unión a Ang-2 (o péptidos) está/están en N-terminal al dominio Fc, y los sufijos "C", "(C)" o "-C" indican que el péptido de unión a Ang-2 (o péptidos) está/están en C-terminal con el dominio Fc. Además, 2xCon4 (C) 1 K, como se define en la SEC ID N° 25, también se puede nombrar sin el sufijo "1 K" en el presente documento.

- 5 10 La secuencia de aminoácidos de la porción Fc de cada pepticuerpo es como sigue (desde el extremo amino al extremo carboxilo):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPS
 RDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 LSPGK (SEQ ID NO: 60)

La secuencia de ADN (SEC ID Nº 33-53) que codifican los pepticuerpos que corresponden al pepticuerpo de SEC ID Nº 12 - 32, respectivamente, en la Tabla 4) se expone a continuación:

SEQ ID NO: 33

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCT
 GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCAGGTGGGG
 ACAAAACTCACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGG
 GACCGTCAGTTCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGAT
 CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGGCCACGA
 AGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACGTAC
 CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC
 GAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGT
 GTACACCCCTGCCCTATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGT
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC
 CCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTTACAGCAAGCTCACC
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTCCGTGAT

5

SEQ ID NO:34

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCTGTACGAACA
 GTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCAGGTGGGGACAAACTCA
 CACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGT
 TTCTCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACC
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
 GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCA
 TCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCC
 CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTGACGCTGACCT
 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAG
 AATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGA
 CTCCGACGGCTCCTCTTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAG
 CAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
 TCTGCACAACCACGACAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAA
 ATAA

SEQ ID NO:35

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCTGTACGAACA
 GTTCACTTCCAGCAGGGATCCGGTCTGCTACTGGTGGTCCGGCTCC
 ACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGCAGTCATCTCGAGGGTGGAGGC
 GGTGGGGACAAAACACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACTC
 CTGGGGGACCGTCAGTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACC
 CTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTG
 AGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACA
 GCACGTACCGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCA
 GCCCCCACATCGAGAAAACATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAA
 CCAGGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTATCCCAGCGACAT
 CGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGA
 CCACGCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAA
 GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
 TCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

SEQ ID NO:36

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCT
 GTACGAACAGTTCACTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGG
 TAAGTTCAACCCACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGIT
 CACTTTCCAGCAACTCGAGGGTGGAGGCAGTGGGGACAAAACTCACA
 CATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGITT
 TCCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCC
 CTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG
 GTCAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
 ACAAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
 CGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
 CTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCAGAACACCACAGGTGTACACCCCTGC
 CCCCACATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAAGCCTGACCTGCC
 TGGTCAAAGGCTCTATCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCTCCGTGCTGGAC
 TCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAAACCACTACACGCAGAACAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAA
 TAA

SEQ ID NO:37

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCTGTACGAACA
 GTTCACTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCC
 ACTGGATGAGCTGGAAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTCCAGCA
 ACTCGAGGGTGGAGGCAGTGGGGACAAAACACACATGTCCACCTT

GCCCAGCACCTGAACCTGGGGGGACCGTCAGTTTCCCTTCCCCC
 AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATG
 CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTG
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
 AGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
 TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAA
 AGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGG
 ATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCG
 GAGAACAACTACAAGACCAACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCC
 TTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
 TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

SEQ ID NO:38

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAACATGCGAATGGGACCCATGGACTTGC
 ACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACACATGTC
 CACCTTGCCCAGCACCTGAACCTGGGGGGACCGTCAGTTTCCCTCTT
 CCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACACAGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCTGCCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCAACTACAGCAGAACAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

SEQ ID NO:39

ATGCAGGAAGAACATGCGAATGGGACCCATGGACTTGC
 AACACATGGTCTGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTCA
 GGCAGTGCAGTCACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACATCA
 CACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTGGGGGGACCGTCAGT
 TTCCCTCTCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACC
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
 GACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA
 TCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCTG

CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAGCCTGACCTGC
 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGC
 AATGGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGA
 CTCCGACGGCTCCITCTCCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAG
 CAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGC
 TCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAA
 ATAA

SEQ ID NO:40

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAACGAAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGC
 ACACATGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAG
 CTCTGGTTCAAGGCAGTGCAGTCATCAGGAAGAACGAAATGCGAATGGGACCC
 ATGGACTTGCACACATGCTCGAGGGTGGAGGCAGGTGGGGACAAAA
 CTCACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGT
 CAGTTTCCCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCATGATCTCCCG
 GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
 CTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
 CCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
 GTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
 TACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACCACAGGTGTACAC
 CCTGCCCTCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACGAGTCAGCCTGAC
 CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGA
 GAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTCTTCTACAGCAAGCTACCGTGGACA
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTCCGTATGCATG
 AGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAATAA

SEQ ID NO:41

ATGGACAAAACTCACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG
 GGGGACCGTCAGTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCGTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 ACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
 CGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTC
 CGTGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
 GCTGGACGAGCTGGAAGAGACTCTGTACGAACAGTTACTTTCAACA
 GCTCGAGTAA

SEQ ID NO:42

ATGGACAAAACACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG
GGGGGACCGTCAGTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
ATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCC
ACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTC
CGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAACAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGITC
TGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTCAAGGAGTGC
GAATCATAAAATTCAACCCGCTGGACGAACGGAAACTCTGTACGA
ACAGTTCACCTTCCAGCAACTCGAGTAA

SEQ ID NO:43

ATGGACAAAACACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG
GGGGGACCGTCAGTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
ATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA

5

ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCC
ACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTC
CGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAACAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
GCTGGACGAACGGAAAGAAACTCTGTACGAACAGTTCACTTCCAGCA
GGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCCACTGGATGAGCT
GGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTCCAGCAACTCGAGTAA

SEQ ID NO:44

ATGGACAAAACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG
GGGGGACCGTCAGTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
ATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCGACATCGC
CGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTC
CGTATGATGCGATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
GCGAATGGGACCCATGGACTTGCACACATGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:45

ATGGACAAAACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG
GGGGGACCGTCAGTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
ATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCGACATCGC
CGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTC
CGTATGATGCGATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGCACAGGGATCCGGITC
TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTGGTTAGGCAGTGC
GACTCATAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCACACACA
TGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:46

ATGGACAAAACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG
 GGGGGACCGTCAGTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
 GGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 ACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGAGAGCAATGGGAGCAGGGAGAACAACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTC
 CGTGTGCACTGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
 GCGAATGGGACCCATGGACTTGCACACATGGATCCGGTCTGCTA
 CTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTGGTCAAGCAGCGCAGCTC
 ATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCACACATGCTC
 GAGTAA

SEQ ID NO:47

ATGGGTGCACAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCAC
 CATGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAATTCAACCCGCTGGACGA
 ACTGGAAGAAACTCTGTACGAACAGTTCACTTCCAGCAGGGATCCGG
 TTCTGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTCAAGGAGT
 GCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGgGACAAAACACATGT
 CCACCTTGCAGCACCTGAACCTGGTCCAGCTGAGGTCAAGT
 TCCCTCTTCCACCGCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGG
 TCACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGT
 TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACGTACCGTGTGGTCAGCGCCTC
 ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACCAGGTGTACACCCTGCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAACCGTGCCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCAGCGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTCTTCCCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

SEQ ID NO:48

ATGGACAAAACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG
 GGGGGACCGTCAGTTCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
 ATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 ACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCAGGGAGAACAACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTC
 CGTGTGCAATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
 TGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTCAGGCAGTGC
 GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAATGGAAGAAACTCTGTACGA
 ACAGTTCACTTCCAGCAGGGTGGCGGTGGTCAGGAAGAATGCGA
 ATGGGACCCATGGACTTGCACATGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:49

ATGGGTGCACAGTCGACTACTCGAAGGTGTTGAAGACCCGTTCACT
 TTCGGTTGCGACAACCAACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAAC
 TCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTC
 AGTTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCG
 ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
 CAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGCAAGGAGTA
 CAAGTGCAAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC
 CATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCC
 TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACGCTGACCT
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGA
 GCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTG
 GACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
 GCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGT
 AAATAA

SEQ ID NO:50

ATGGGTGCACAGCAGTACGGTGCACGGTTCTGTACGGTGCATG
 ATCAACCTCGAGGGTGGAGGCAGTGGGGACAAAACACATGTCC
 ACCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTTC
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
 GCAGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
 CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAG
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAA
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCC
 CGGGATGAGCTGACCAAGAACCGAGGTCAACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGC
 AGCCGGAGAACAAACTACAAGAACACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAATAA

SEQ ID NO:51

ATGGGTGCACAGAAACGCCATGCGAAGAAATGTGGGGTGGTGC
 ATACGACCTCGAGGGTGGAGGCAGTGGGGACAAAACACATGT
 CACCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTT
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCAGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAACAGGTCAACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGG
 CAGCCGGAGAACAAACTACAAGAACACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAATAA

SEQ ID NO:52

ATGGGTGCACAGCACCAAGATCTGCAAATGGGACCCGTGGACCTG
 CAAACACTGGCTCGAGGGTGGAGGCAGTGGGGACAAAACACATGT
 CACCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTT
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCAGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA

AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACGCCCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAATAA

SEQ ID NO:53

ATGGGTGCACAGAAACGTCCATGCGAAGAAATCTCGGTGGTGCACC
 TACCAGCTCGAGGGTGGAGGCGTGGGGACAAAACTCACACATGTCC
 ACCTTGCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTTTCCTCTC
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGITC
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
 GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
 CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCATCC
 CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGC
 AGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAATAA

Ejemplo 6

5 Ensayos de pepticuerpos

Catorce de los pepticuerpos se analizaron usando el ELISA de neutralización y tres de los pepticuerpos se analizaron usando el ELISA de afinidad. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

	hAng-2		mAng-2		hAng-1	
Epticuerpo	CI 50 (nM)	CE 50 (nM)	CI 50 (nM)	CE 50 (nM)	CI 50 (nM)	CE 50 (nM)
2xCon4 (C) 1K	0,04		0,02			
Con4-L1 (C)	0,05		0,04			
Con4 (C)	0,2		0,3			
2xL1 (N)	0,65		0,8			
Con4 (N)	0,85	0,03	0,72	0,07	Sin inhibición	
2xL1 (C)	0,9		1			
Con4 (N) 1K-WT			1,9			
L1 (N)	6		11		Sin inhibición	
C17 (N)	9		13		Sin inhibición	
12-9 (N)	21		7,7		Sin inhibición	
Con1 (N)	26		~ 200		Sin inhibición	
8-14 (N)	45		33		Sin inhibición	
L1 (C)	65		37			

	hAng-2		mAng-2		hAng-1	
Epticuerpo	Cl 50 (nM)	CE 50 (nM)	Cl 50 (nM)	CE 50 (nM)	Cl 50 (nM)	CE 50 (nM)
8-8 (N)	80		~ 700		Sin inhibición	
Control negativo						
Pepticuerpo 4883	Sin inhibición	Sin unión	Sin inhibición	Sin unión	Sin inhibición	Sin unión

La secuencia de aminoácidos del pepticuerpo 4883 control negativo es como sigue (la porción Fc está subrayada, el enlazador es "GGGGG", y la porción péptido está en negrita):

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKD^{TL}MISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN^{AKT}KPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP^{REPOVY}TLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKG^{FYPSDIA}VEWESNGOPENNYK^{TPPVLD}
SDGSFFLYSKLTVDKSRW^{QGNF}SCSVMHEALHNHYTQ^{KSLS}
PGK-GGGGG-CTAGYHWNSDCECCR^{RRN} (SEQ ID NO: 243)

- 5 Se apreciará que con el uso de la expresión "Sin inhibición" en el presente documento no se quiere pretende indicar que los compuestos no tienen calidades inhibidoras. En su lugar, "Sin inhibición" como se usa en el presente documento, se refiere los compuestos que cuando se analizan usando el ELISA de neutralización en las condiciones descritas en el presente documento mostraban un valor de Cl_{50} mayor que 1000 nM, que era la mayor concentración a la que estos compuestos se seleccionaron. Aunque no se observaron calidades inhibidoras significativas para las 10 moléculas marcadas como que muestran "sin inhibición", se apreciará que las moléculas pueden, de hecho, demostrar las calidades inhibidoras en condiciones de ensayo diferentes, o en diferentes ensayos. En una realización preferida se apreciará que la invención se refiere a pepticuerpos que tienen calidades inhibidoras usando los ensayos descritos en el presente documento.
- 15 Dos de los pepticuerpos se analizaron usando el ensayo de afinidad BIACore (como se describe en el Ejemplo 2). Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Afinidades del pepticuerpo (Pb) por hAng-2 y mAng-2						
	hAng-2			mAng-2		
Pepticuerpo	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
Pb L1 (N)	3,1	$2,9 \times 10^5$	$9,1 \times 10^{-4}$	0,425	$5,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$
Con4 (N)	0,67	$3,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-4}$	0,6	$7,3 \times 10^5$	$4,4 \times 10^{-4}$
TN12-9 (N)	8,2	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-3}$	0,32	$7,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$

Ejemplo 7

Estudios de eficacia terapéutica con pepticuerpo de Ang-2 administrado de manera sistémica

- 20 El pepticuerpo de Ang-2, TN8-Con4-C, se administró por vía subcutánea a ratones portadores del tumor A431 según una pauta de una vez al día 72 horas después de la exposición del tumor. Las dosis de pepticuerpo usadas fueron 1000, 200, 40 y 8 ug/ratón/día. Se administró un total de 20 dosis a todos los animales. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron tres veces a la semana. Al final del estudio, se sacrificó a los animales y se recogieron sus sueros para la medición de los niveles del pepticuerpo mediante ELISA. Se recogieron los 25 tumores un panel de tejidos normales de todos los grupos.

- 30 Los resultados se muestran en La figura 1. Como se puede ver, se observaron diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre el grupo tratado con el pepticuerpo de Ang-2 y el vehículo control. Las cuatro dosis de pepticuerpo de Ang-2 inhibieron el crecimiento del tumor en comparación con los controles vehículo ($p < 0,0001$ frente al control vehículo usando ANOVA de medidas repetidas). Por el contrario, los tumores en el grupo de control continuaron creciendo a una velocidad mucho mayor. El tratamiento con este pepticuerpo no tuvo ningún efecto significativo sobre los pesos corporales terminales, los pesos de los órganos o los parámetros de hematología de los animales tratados con las dosis anteriores.

Ejemplo 81. Construcción de genotecas de Péptidos de Ang-2 secundariosA. Células de E. coli electrocompetentes

5 Células de electroporación competentes Epicurian Coli@ XLI-Blue MRF' (Stratagene nº 200158) se adquirieron de Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA).

B. Modificación del vector de pCES1

10 Se realizó la PCR usando los Sistemas de PCR de Molde de Larga Extensión (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) con 1 µg del vector pCES1 (TargetQuest Inc.) como molde. El volumen de la mezcla para PCR fue 100 µl que contenían tampón 1 x PCR, 200 nM de cada uno de los dos cebadores-. 5'-CAAACGAATGGATCCTCATTAAAGCCAGA-3' (SEC ID Nº: 244) y 5'-GGTGGTGCGGCCGCACTCGAGACTGTTGAAAGTTGTTAGCA-3' (SEC ID Nº: 245), dNTP 200 nM y 3 unidades (U) Tag ADN polimerasa. El sistema TRIO-Thermoblock (Biometra) PCR se realizó del siguiente modo: 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94% durante 30 segundos, 50% durante 30 segundos, 72% durante 45 segundos; y 72% durante 10 minutos; enfriar hasta 4°C. Los productos de la PCR se desarrollaron después sobre un gel de agarosa al 1% y se purificaron con QIAGEN Spin Column (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se realizó una segunda reacción de PCR con 5 µl de productos para PCR y 200 nM de cada uno de los dos cebadores 5'-CAAACGAATGGATCCTCATTAAAGCCAGA-3' (SEC ID Nº 246) y 5'-AACACAAAAGTGCACAGGGTGGAGGTGGTGGTGCAGGCCGC-3' (SEC ID Nº 247, las mismas condiciones de PCR que las descritas anteriormente).

20 Los productos de la PCR y el vector pCES1 original se digirieron después por separado en 100 µl de reacción que contenía tampón 1 x NEB2, 60 U de ApaLI (New England Biolabs, Beverly, MA), 60 U de BamHI (New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. A continuación, el ADN digerido se purificó usando una columna QIAGEN Spin Column y se ligó conjuntamente en 40 µl de reacción que contenía 1x tampón de ligamiento y 40 U de T4 ADN ligasa (New England Biolabs) a temperatura ambiente durante toda la noche.

25 Los vectores se transfeccionaron en E. coli y se incubaron a 37°C durante la noche. Las colonias individuales aisladas se seleccionaron y, después, se purificó el plásmido usando una columna QIAGEN Spin Column. Mediante secuenciación de ADN se confirmó la inserción correcta.

C. Preparación del ADN del vector

30 Un microgramo de ADN del vector de pCES1 modificado (de la sección 1B anterior) se transformó en 40 µl de XLI - blue E. coli electrocompetente (de la sección 1A anterior) usando el Gene Pulser II (BIO-RAD, Hercules, CA) fijado a 2500 V, 25 µF, y 200 ohms. La muestra de bacterias transformadas se transfirió después inmediatamente a un tubo que contenía 960 µl de SOC (2% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, glucosa 20 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM), y el cultivo se dejó crecer a 37°C con agitación durante 1 hora.

35 Después, las células se extendieron sobre la placa de agar 2xYT (2xYT con 100 ug/ml de ampicilina, 12,5 ug/ml de tetraciclina y 2% de glucosa) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se confirmó una sola colonia mediante secuenciación y se usó para inocular 2 litros de medio 2xYT a 37°C con agitación durante la noche. El ADN del vector plasmídico se purificó con el kit de QIAGEN Plasmid Maxi de acuerdo con los protocolos del fabricante.

D. Digestión del ADN del vector

40 Aproximadamente 2000 microgramos totales de ADN del vector (de la sección 1C anterior) se digirieron en 5000 µl de reacción que contenía 1x tampón 2 NEB, 300 U de ApaLI y 300 U de Xhol a 37°C durante toda la noche. La reacción de digestión de restricción se incubó durante toda la noche a 37°C y se analizó en un gel de agarosa al 0,8% prefabricado (Embi Tec, San Diego, CA). A continuación, el ADN del vector linealizado se escindió del gel y se extrajo con el Kit de Extracción de Gel QIAquick (QIAGEN Inc.) de acuerdo con las direcciones del fabricante.

E. [Preparación de oligonucleótidos de la genoteca

45 Seis oligonucleótidos de genoteca (1 fijado y 5 dopados) se diseñaron basándose en las secuencias que se derivan de los resultados descritos anteriormente. Los oligonucleótidos de la genoteca fijada eran:

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKNNKNNKNNKS ARTGGGATCCGTGGASCNNKNNKNNKNN-
KNKN-NNKCATT CTCTCGAGATCA-3' (número de genoteca 20) (SEC ID Nº 248);

y dos del 70% de los oligonucleótidos de la genoteca dopados eran como sigue:

50 5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKaaKcgKccKnnKga KgaKatKttKggKggKnnKacKtaKcaKnnKnnKnnKcat-
TCTC TCGAGATCA-3' (número de genoteca 27); (SEC ID Nº 249);

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKnnKcat-

-TCTCTCGAGATCA-3' (número de genoteca 99); (SEC ID Nº 250);

Las letras en minúscula representan una mezcla del 70% de la base indicada y el 10% de cada uno de los tres nucleótidos). Los otros tres del 91% de los oligonucleótidos de la genoteca dopados eran como sigue:

5' CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKcaKgaKgaKTGCgaKtg KgaKccKtgKacKTGCgaKcaKatKNNKNNKNNKCAT-
5 TCTCTCGAGA TC A-3' (número de genoteca 94); (SEC ID Nº: 251);

5' CACAGTGCACAGGGTNNKttKgaKtaKNNKgaKggKgtKgaKgaKcc KttKacKttKggKNNKgaKaaKcaKNNKCAT-
TCTCT-CGAGATCA-3' (número de genoteca 25); (SEC ID Nº: 252);

y

5' CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKCAT-
10 -TCTCTCGAGATCA-3' (número de genoteca 26); (SEC ID Nº 253);

Para los oligos anteriores, los expertos en la técnica apreciarán que "N" indica que cada uno de los cuatro nucleótidos (A, T, C, y G) se representan de igual forma durante la síntesis de oligo, y "K" indica que los nucleótidos G y T se representaron de igual manera durante la síntesis de oligo. Las letras en minúscula representan una mezcla del 91 % de la base indicada y el 3 % de cada uno de los tres nucleótidos. Cada uno de estos oligonucleótidos se usó como molde en la PCR.

15 El kit de Sistema de PCR de Fidelidad de Alta Expansión (Roche Diagnostics Corp.) se usó para las reacciones de PCR. Cada oligo de la genoteca se amplificó en una placa de reacción de PCR de 96 pocillos de 50 µl que contenía 1 nM de un oligonucleótido de genoteca, 1X del tampón de PCR, 300 nM de cada uno de los cebadores:

5'-CACAGTGCACAGGGT-3' (SEC ID Nº 254);

20 y

5'-TGATCTCGAGAGAATG-3', (SEC ID Nº: 255);

25 dNTP 200 µM, MgCl₂ 1,5 mM y 350 U de la polimerasa de expansión. El termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) para llevar a cabo el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos; 25 ciclos de (94°C durante 30 segundos, 52.5°C durante 60 segundos, 72% durante 30 segundos); 72% durante 10 minutos; enfriar hasta 4°C. Los nucleótidos libres se retiraron después usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick (QIAGEN Inc. Nº de catálogo 28104) de acuerdo con los protocolos del fabricante.

F. Digestión de los oligonucleótidos de la genoteca

30 Para cada genoteca los productos de PCR (sección IE) se digirieron en una reacción de 1200 µl que contenía tampón 2 1 x NEB, 750 U de ApaLI y 750 U de Xhol a 37°C durante la noche. El ADN digerido se separó sobre un gel de agarosa al 3% prefabricado (Embi Tec). La banda de ADN de interés para cada reacción se cortó del gel y se extrajo con filtro de tubo de centrífuga COSTAR Spin-X, 0,22 µm de acetato de celulosa (Corning Inc., Nº de catálogo 8160).

G. Ligamiento del vector con los oligonucleótidos de la genoteca

35 Los 450 µl de la reacción de ligamiento contenían el vector linealizado (sección 1D) y cada producto de PCR de la genoteca digerido (sección F) a una relación molar de 1:5, 1 x NEB de tampón de ligamiento, y 20.000 U de T4 ADN ligasa al 16% durante toda la noche. Los productos ligados se incubaron a 65°C durante 20 minutos para inactivar la T4 ADN ligasa y además se incubaron con 100 U de NotI a 37°C durante 2 horas para minimizar el autoligamiento del vector. Los productos ligados después se purificaron mediante una extracción en fenol/cloroformo convencional (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., 3a Edición, Cold Spring Harbor Laboratoy Press, 2000) y se volvieron a suspender en 120 µl de H₂O.

H. Transformación por Electroporación

40 Para cada genoteca, se realizaron doce reacciones de electroporación. Para cada transformación, 10 µl del ADN del vector ligado (sección 1G) y 300 µl de células XL1 -BLUE MRF' (sección 1A) se mezclaron en una cubeta de 0,2 -cm (BIO-RAD). La mezcla resultante se sometió a pulsos mediante el Pulsador II de Genes fijado a 2500 V, 25 uF, y 200 ohms. Las bacterias transformadas de las doce reacciones de electroporación se combinaron después y se transfirieron en un matraz que contenía 26 ml de SOC para incubación a 37°C durante 1 hora. Las células se añadieron a 450 ml de 2xYT y se cultivaron a 37°C con agitación durante 5 horas. Las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Después, los sedimentos celulares se volvieron a suspender en 12 ml de 15% de glicerol/12xYT y se almacenaron a -80°C. Esta era la reserva primaria de las genotecas. Los títulos mostraron tamaños de genoteca de 5,0 x 10⁹ (número de genoteca 20), 3,3 x 10¹⁰ (número de genoteca 94), 4,7 x 10⁹ (número de genoteca 25), 5,0 x 10⁹ (número de genoteca 26), 3,0 x 10⁹ (número de genoteca 27), y 4,2 x 10⁹ (número de genoteca 99) de transformantes independientes.

2. Amplificación de las GenotecasA. Preparación de reserva secundaria de las Genotecas

A partir de la reserva de células de genoteca primaria (de la sección 1H anterior), se usaron suficientes células para cubrir un exceso 10 X de cada tamaño de genoteca para inocular medio 2xYTAGT (2YT con 100 ug/ml de ampicilina, 12,5 ug/ml de tetraciclina y 2% de glucosa) de manera que la DO₆₀₀ de partida era 0,1. Se dejó que los cultivos se desarrollaran a 37°C con agitación durante varias horas hasta que la DO₆₀₀ = 0,5. Una décima parte de alícuota de cada genoteca se recogió y se desarrolló en matraces separados durante otras dos horas a 37°C. Estos subcultivos se centrifugaron después a 4000 rpm usando un rotor Beckman JA-14 durante 10 minutos a 4%, y se volvieron a suspender los sedimentos de bacterias en 7,0 ml (para cada genoteca) de 15% de glicerol 12xYT para almacenamiento a -80°C.

B. Inducción del fago

Alícuotas del fago auxiliar M13K07 (Amersham Pharmacia Biotech) se añadieron a los cultivos bacterianos restantes a una DO₆₀₀ = 0,5 (de la Sección 2A anterior) hasta la concentración final de 3×10^9 ufp/ml. Se dejó que el fago auxiliar infectara las bacterias a 37°C durante 30 minutos sin agitación y 30 minutos con agitación lenta. Las células infectadas se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se volvieron a suspender los sedimentos de células en el mismo volumen (de la sección 2A anterior) con el medio 2xYTAK (2YT con 100 ug/ml de ampicilina y 40 ug/ml de kanamicina). La producción de fagémido se dejó que se produjera a 30°C durante toda la noche con agitación.

C. Recogida del fago

Los cultivos de bacterias de la sección 2B anterior se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron después en nuevas botellas, y se añadieron 0,2 volúmenes de 20% de PEG/2,5 M de NaCl y se incubaron sobre hielo durante 1 hora para precipitar los fagémidos. Los v precipitados se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se volvieron a suspender cuidadosamente con 100 ml de PBS fría. La solución de fagémido se purificó además mediante centrifugación de las células remanentes con 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y precipitación de los fagémidos mediante la adición de 0,2 volúmenes de 20% de PEG/2,5M de NaCl. Los fagémidos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4X, y los sedimentos de fagémidos se volvieron a suspender con 18 ml de PBS fría. Se añadieron seis ml de 60% de glicerol a la solución de fagémido para almacenamiento a -80°C. Las titulaciones del fagémido se determinaron mediante un procedimiento estándar (Molecular Cloning, Maniatis et al 3a Edición).

3. Selección del fago de unión a Ang-2A. Inmovilización de Ang-2 sobre perlas magnéticas

El Ang-2 biotinilado (de la sección 3A anterior) se inmovilizó sobre el Dynabead M-280 Streptavidin (DYNAL, Lake Success, NY) a una concentración de 2000 ng de proteína Ang-2 por 100 µl de la reserva de perlas del fabricante. Sacando las perlas a un lado de un tubo usando un imán y retirando por pipeteo el líquido, las perlas se lavaron cinco veces con la solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se volvieron a suspender en PBS. La proteína Ang-2 biotinilada se añadió a las perlas lavadas a la concentración anterior y se incubó con rotación durante 1 hora a temperatura ambiente. Las perlas recubiertas con Ang-2 se bloquearon mediante la adición de BSA hasta 2 % de concentración final e incubación durante la noche a 4°C con rotación. Las perlas recubiertas con Ang-2 resultantes se lavaron dos veces con PBST (PBS con 0,05% de Tween-20) antes de someterse a los procedimientos de selección.

B. Selección usando las perlas recubiertas con Ang-2

Fagémidos equivalentes a aproximadamente 1000 veces una genoteca (de la sección 2C anterior) se bloquearon durante una hora con 1 ml de PBS que contiene 2% de BSA. La muestra de fagémido bloqueado se sometió a tres etapas de selección negativa mediante la adición de perlas vacías (las mismas perlas que en la sección 3A pero sin revestimiento de proteína Ang-2), y esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con rotación. El sobrenadante que contenía fagémido se extrajo usando un imán y se transfirió a un segundo tubo que contenía perlas vacías (las mismas perlas que en la sección 3A pero sin proteína Ang-2 cubriendo), y esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con rotación.

Se repitió el procedimiento. El sobrenadante que contenía el fagémido se extrajo después usando imán y se transfirió a un nuevo tubo que contenía perlas revestidas con proteína Ang-2 (de la sección 3A), y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con rotación. Después se desecharon el sobrenadante, se lavaron las perlas unidas a fagémido 10 veces con 2% de leche-PBS; 10 veces con 2% BSA-PBS; 10 veces con PBST y dos veces con PBS. Después se dejó que los fagémidos eluyeran en 1 ml de solución de trietilamina 100 mM (Sigma, St. Louis, MO) durante 10 minutos en un aparato rotatorio. El pH de la solución que contiene fagémido cose neutralizó mediante la adición de 0,5 ml de 1 M Tris-HCl (pH 7,5). Los fagémidos resultantes se usaron para infectar 10 ml de bacterias XLI -Blue MRF' recientemente desarrolladas (DO₆₀₀ aproximadamente 0,5) a 37°C durante 30 minutos sin agitación y 30 minutos con agitación lenta. Después, todas las células de XLI-BLUE MRF' se sembraron sobre una

placa 15 X 15 cm 2xYTAG y se incubaron a 30°C durante toda la noche.

C. Inducción y recogida de Fagos

Una alícuota de 10 ml de medio 2xYTAGT se añadió a la placa (de la sección 3B) para volver a suspender las células XL1-BLLTE MRF'. Se recogieron todas las células XLI-BLUE MRF' en un tubo, y una alícuota de 250 µl de estas células se añadió a 25 ml de 2xYTAGT y se desarrollaron a 37°C hasta la $DO_{600} = 0,5$. El fago auxiliar M13K07 se añadió hasta una concentración final de 3×10^9 ufc/ml y se incubó a 37°C durante 30 minutos sin agitación y 30 minutos con agitación lenta. Se centrifugaron las células con 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se volvieron a suspender con 25 ml de 2xYTAG. Se dejó que estas bacterias se desarrollaran a 30°C durante toda una noche con agitación. Se recogieron los fagémidos inducidos y se purificaron como en la sección 2C.

10 D. Segunda Ronda de Selección

La Segunda Ronda de Selección se realizó como se indica en la sección 3B a 3C excepto para lo siguiente. Aproximadamente fagémidos equivalentes a aproximadamente 100 veces una librería que resultan de la sección 3C se usó como el fagémido de entrada. La cantidad de proteína Ang-2 biotinilada (sección 3A) revestida sobre Dynabead M-280 Streptavidin se disminuyó hasta 20 ng. Las perlas unidas a los fagos se lavaron después 10 veces con 2% de leche -PBS; 10 veces con 2% de BSA-PBS; 10 veces con PBST, y el lavado final implicó 60 minutos de incubación a temperatura ambiente en PBST. Las perlas se lavaron dos veces con PBS. Las condiciones de elución eran las mismas que en la primera ronda (sección 3B).

15 E. Tercera Ronda de Selección

La tercera Ronda de Selección se realizó como se indica en la sección 3B a 3C excepto por lo siguiente. Aproximadamente fagémidos equivalentes a aproximadamente 10 veces una librería que resultan de la sección 3D se usó como el fagémido de entrada. Se usaron aproximadamente 2 ng de proteína Ang-2 biotinilada (de la sección 3A) para recubrir las Dynabead M-280 Streptavidin. Las perlas unidas a los fagos se lavaron 10 veces con 2% de leche -PBS; 10 veces con 2% de BSA-PBS; 10 veces con PBST, y el lavado final implicó 60 minutos de incubación a temperatura ambiente en PBST. Las perlas se lavaron dos veces con PBS. Las condiciones de elución eran las mismas que en la primera ronda (sección 3B).

20 F. Cuarta Ronda de Selección

La cuarta Ronda de Selección se realizó como se indica en la sección 3B a 3C excepto por lo siguiente. Los fagémidos equivalentes de la genoteca que se producen en la sección 3E se usaron como el fagémido de entrada. La cantidad de proteína Ang-2 biotinilada (sección 3A) revestida sobre Dynabead M-280 Streptavidin se disminuyó hasta 0,4 ng para las genotecas 25, 26, y 27. Para las genotecas 20 y 94, la cantidad de revestimiento se mantuvo como en la tercera ronda a 2 ng. La genoteca 99 no se llevó a cabo hasta la cuarta etapa de la ronda de selección. Las condiciones de elución eran las mismas que en la primera ronda (sección 3B).

25 4. ANÁLISIS CLONAL

A. Preparación de la placa maestra

30 Se recogieron colonias individuales de la segunda ronda de selección y se inocularon en placas de 96 pocillos que contenían 120 µl de 2xYTAGT por pocillo. Las placas de 96 pocillos se incubaron en un agitador a 30°C durante toda la noche. Se añadieron cuarenta microlitros de 60% de glicerol por pocillo APRA almacenamiento a -80 °C.

35 B. ELISA para fagémidos

40 Alícuotas de aproximadamente 2 µl de células de la placa maestra (de la sección 4A anterior) se inocularon en una placa de 96 pocillos Costar® nueva (Corning Incorporated, Corning, NY, nº de catálogo 9794) que contenía 100 µl de 2xYTAGT por pocillo, y esta nueva placa de células se desarrolló a 37°C hasta aproximadamente una $DO_{600} = 0,5$.

45 Se añadieron a cada pocillo cuarenta µl de 2xYTAGT que contenía fago auxiliar M13K07 ($1,5 \times 10^{13}$ ufc/ml) y la placa de 96 pocillos se incubó a 37°C durante 30 minutos sin agitación y otros 30 minutos con agitación lenta. La placa se centrifugó a 2000 rpm (centrífuga de mesa Beckman CS-6R) durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se retiraron de los pocillos y cada sedimento de células se volvió a suspender usando 150 µl de 2xYTAG por pocillo. La placa se incubó a 30°C durante la noche para la expresión de fagémido.

50 La proteína Ang-2 humana se revistió en la placa de 96 pocillos Maxisorp (NUNC) a 1 µg/ml en 1xPBS a 4°C durante toda la noche. Como control, 2% de BSA (Sigma) se revistió sobre una placa Maxisorp separada. Al día siguiente, los cultivos de células de toda una noche se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se transfirieron diez µl de sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos que contenía solución BSA/PBS para diluir el sobrenadante a 1:10. Las mezclas resultantes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación para bloquear los fagémidos. Mientras tanto, la placa revestida con proteína Ang-2 se bloqueó con 400 µl de solución al 2% de BSA/PBS por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. La solución de BSA se desechó, y cada pocillo se lavó tres veces con solución de PBS. Después de la última etapa de lavado, se

añadieron 100 μ l de soluciones de fagémidos bloqueados a cada pocillo de la placa revestida con proteína Ang-2 así como la placa control y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El líquido se desechó, y cada pocillo se lavó tres veces con solución de PBST. Se añadieron 100 μ l de mAb anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) a una dilución de 15.000 a cada pocillo de las placas revestida con proteína Ang-2 y control, y estas placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El líquido se desechó de nuevo, y cada pocillo se lavó tres veces con solución de PBST. Se añadieron cien μ l de sustratos quimioluminiscentes LumiGLO (Laboratorios Kirkegaard y Perry, Gaithersburg, MD) a los pocillos, y cada pocillo se leyó mediante la máquina Luminoskan AFCENT DL (Labsystems, Franklin, MA).

C. Secuenciación de los clones de fago

10 La reacción de PCR se realizó usando 1 μ l de bacterias de cada pocillo de la placa maestra (sección 4A) como molde. El volumen de cada mezcla de PCR era 50 μ l que contiene tampón 1 x PCR, 300 nM de cada uno de los dos cebadores:

5'-GTTAGCTCACTCATTAGGCAC-3' (SEC ID Nº: 256) y

5'-GTACCGTAACACTGAGTTCG-3', (SEC ID Nº 257);

15 dNTP 200 μ M, MgCl₂ 2 mM y 2,5 U de de taq ADN polimerasa (Roche Molecular Biochemicals). El GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) para llevar a cabo el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos; 40 ciclos de (94°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos, 72°C durante 90 segundos); 72°C durante 10 minutos; enfriar hasta 4°C. Los productos de PCR se purificaron con el Kit de Purificación QIAquick 96 PCR (QIAGEN Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los productos de PCR purificados se secuencian con el 20 cebador 5'-TTACACTTTATGCTTCG-3' (SEC ID Nº 258) usando el secuenciador ABI 3770 (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5. Clasificación de Secuencias

25 Las secuencias de péptidos que se tradujeron de secuencias de nucleótidos variables (sección 4C) se correlacionaron con los datos de ELISA. Los clones que mostraban una DO alta en los pocillos revestidos con Ang-2 y una DO baja en los pocillos revestidos con BSA se consideraron más importantes. A las secuencias que aparecieron múltiples veces también se consideraron importantes. Veinticuatro secuencias de péptido de la genoteca 20, 26 secuencias de péptido de la genoteca 94, 7 secuencias de péptido de la genoteca 25, 18 secuencias de péptido de la genoteca 26, 6 secuencias de péptido de la genoteca 27, y 4 secuencias de péptido de la genoteca 99 se eligieron para análisis adicional y la generación de pepticuerpos. De manera adicional, once secuencias de consenso de las genotecas 20 y 94, tres secuencias de consenso de las genotecas 26 y 99, y dos de la genoteca 25 se dedujeron y se usaron para generar pepticuerpos. Los pepticuerpos en la Tabla 7 se evaluaron usando el protocolo de ELISA de Neutralización descrito en el Ejemplo 10 en el presente documento. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Pc derivados de Con4 de afinidad madurada	hAng-2:Tie2 Cl ₅₀ (nM)	Secuencia del pepticuerpo (SEC ID Nº)
Con4-44 (C)	0,09	M-Fc-GGGGGAQ – PIRQECDWDPWTCEHMWEV-LE (SEC ID Nº 259)
Con4-40 (C)	0,10	M-Fc-GGGGGAQ- TNIQEECEWDPWTCDHMPGK-LE (SEC ID Nº 260)
Con4-4 (C)	0,12	M-Fc-GGGGGAQ – WYEQDACEWDPWTCEHMAEV-LE (SEC ID Nº 261)
Con4-31 (C)	0,16	M-Fc-GGGGGAQ – NRLQBVCBWDPWTCEHMENV-LE (SEC ID Nº 262)
Con4-C5 (C)	0,16	M-Fc-GGGGGAQ – AATQBECEWDPWTCEHMPRS-LE (SEC ID Nº 263)
Con4-42 (C)	0,17	M-Fc-GGGGGAQ – LRHQEGCEWDPWTCEHMFDW-LE (SEC ID Nº 264)

Pc derivados de Con4 de afinidad madurada	hAng-2:Tie2 Cl ₅₀ (nM)	Secuencia del pepticuerpo (SEC ID Nº)
Con4-35 (C)	0,18	M-Fc-GGGGGAQ- VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG-LE (SEC ID Nº 265)
Con4-43 (C)	0,18	M-Fc-GGGGGAQ- SISHEECEWDPWTCEHMQVG-LE (SEC ID Nº 266)
Con4-49 (C)	0,19	M-Fc-GGGGGAQ- WAAQEECEWDPWTCEHMGRM-LE (SEC ID Nº 267)
Con4-27 (C)	0,22	M-Fc-GGGGGAQ- TWPQDKCBWDPWTCEHMGST-LE (SEC ID Nº 268)
Con4-48 (C)	0,26	M-Fc-GGGGGAQ- GHSQBCGWDWPWTCEHMGTS-LE (SEC ID Nº 269)
Con4-46 (C)	0,26	M-Fc-GGGGGAQ- QHWQEECEWDPWTCDHMPSK-LE (SEC ID Nº 270)
Con4-41 (C)	0,26	M-Fc-OGGGGAQ- NVRQBKCEWDPWTCBHMPVR-LB (SEC ID Nº 271)
Con4-36 (C)	0,28	M-Fc-GGGGGAQ- KSGQVECNWDPWTCEHMPRN-LE (SEC ID Nº 272)
Con4-34 (C)	0,28	M-Fc-GGGGGAQ- VKTQEHCWDWPWTCEHMREW-LE (SEC ID Nº 273)
Con4-28 (C)	0,30	M-Fc-GGGGGAQ- AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM-LE (SEC ID Nº 274)
Con4-39 (C)	0,30	M-Fc-GGGGGAQ- PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM-LE (SEC ID Nº 275)
Con4-25 (C)	0,31	M-Fc-GGGGGAQ- RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK-LE (SEC ID Nº 276)
Con4-50 (C)	0,38	M-Fc-GGGGGAQ- HGQNMECEWDPWTCEHMFRY-LE (SEC ID Nº 277)
Con4-38 (C)	0,40	M-Fc-GGGGGAQ- PRLQEECVWDPWTCEHMPLR-LE (SEC ID Nº 278)
Con4-29 (C)	0,41	M-Fc-GGGGGAQ- RITQEKEWDPWTCEHMESQ-LE (SEC ID Nº 279)
Con4-47 (C)	0,44	M-Fc-GGGGGAQ-

Pc derivados de Con4 de afinidad madurada	hAng-2:Tie2 Cl ₅₀ (nM)	Secuencia del pepticuerpo (SEC ID Nº)
		QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS-LE (SEC ID Nº 280)
Con4-20 (C)	0,48	M-Fc-GGGGGAQ- QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL-LE (SEC ID Nº 281)
Con4-45 (C)	0,48	M-Fc-GGGGGAQ- WAQQEECAWDPWTCDHMVGL-LE (SEC ID Nº 282)
Con4-37 (C)	0,49	M-Fc-GGGGGAQ- LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS-LE (SEC ID Nº 283)
Con4-33 (C)	0,52	M-Fc-GGGGGAQ- PMNQVECDWDPWTCEHMPRS-LE (SEC ID Nº 284)
AC2-Con4 (C)	0,52	M-Fc-GGGGGAQ- FGWSHGCEWDPWTCEHMGST-LE (SEC ID Nº 285)
Con4-32 (C)	0,75	M-Fc-GGGGGAQ- KSTQDDCDWDPWTCEHMVGP-LE (SEC ID Nº 286)
Con4-17 (C)	0,96	M-Fc-GGGGGAQ- GPRISTCQWDPWTCEHMDQL-LE (SEC ID Nº 287)
Con4-8 (C)	1,20	M-Fc-GGGGGAQ- STIGDMCEWDPWTCAHMQVD-LE (SEC ID Nº 288)
AC4-Con4 (C)	1,54	M-Fc-GGGGGAQ- VLGGQQCEWDPWTCAHMQVD-LE (SEC ID Nº 289)
Con4-1 (C)	2,47	M-Fc-GGGGGAQ- VLGGQQCQWDPWTCAHMQVD-LE (SEC ID Nº 290)
Con4-C (C)	2,75	M-Fc-GGGGGAQ- TIIGSMCEWDPWTCAHMQGG-LE (SEC ID Nº 291)
Con4-21 (C)	3,21	M-Fc-GGGGGAQ- TKGKSVCQWDPWTCAHMQSG-LE (SEC ID Nº 292)
Con4-C2 (C)	3,75	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG-LE (SEC ID Nº 293)
Con4-18 (C)	4,80	M-Fc-GGGGGAQ- WVNEVVCEWDPWTCAHMQGG-LE (SEC ID Nº 294)
Con4-19 (C)	5,76	M-Fc-GGGGGAQ- VVQVGMCCQWDPWTCAHMQRLQ-LE

Pc derivados de Con4 de afinidad madurada	hAng-2:Tie2 Cl ₅₀ (nM)	Secuencia del pepticuerpo (SEC ID Nº)
		(SEC ID Nº 295)
Con4-16 (C)	6,94	M-Fc-GGGGGAQ- AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV-LE (SEC ID Nº 296)
Con4-11 (C)	9,70	M-Fc-GGGGGAQ- QGMKMFCEWDPWTCAHIVR-LE (SEC ID Nº 297)
Con4-C4 (C)	9,80	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG-LE (SEC ID Nº 298)
Con4-23 (C)	9,88	M-Fc-GGGGGAQ- TSQRVGCEWDPWTQHLTYT-LE (SEC ID Nº 299)
Con4-15 (C)	15,00	M-Fc-GGGGGAQ- QWSWPPCEWDPWTQTVWPS-LE (SEC ID Nº 300)
Con4-9 (C)	20,11	M-FC-GGGGGAQ- GTPSPFCQWDPWTCSHMVQG-LE (SEC ID Nº 301)
Con4-10 (C)	86,61	M-Fc-GGGGGAQ- TQGLHQCEWDPWTCKVLWPS-LE (SEC ID Nº 302)
Con4-22 (C)	150	M-Fc-GGGGGAQ- VWRSQVCQWDPWTQCNLGGDW-LE (SEC ID Nº 303)
Con4-3 (C)	281,5	M-Fc-GGGGGAQ- DKILEECQWDPWTQFFYGA-LE (SEC ID Nº 304)
Con4-5 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- ATFARQCQWDPWTQCALGGNW-LE (SEC ID Nº 305)
Con4-30 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- GPAQEECEWDPWTCEPLPLM-LE (SEC ID Nº 306)
Con4-26 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- RPEDMCSQWDPWTWHLQGYC-LE (SEC ID Nº 307)
Con4-7 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- LWQLAVCQWDPQTCDHMGAL-LE (SEC ID Nº 308)
Con4-12 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- TQLVSLCEWDPWTQRLLDGW-LE (SEC ID Nº 309)
Con4-13 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- MGGAGRCEWDPWTQCLLQGW-LE (SEC ID Nº 310)

Pc derivados de Con4 de afinidad madurada	hAng-2:Tie2 IC ₅₀ (nM)	Secuencia del pepticuerpo (SEC ID Nº)
Con4-14 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- MFLPNECQWDPWTCSNLPEA-LE (SEC ID Nº 311)
Con4-2 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- FGWSHGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEC ID Nº 312)
Con4-6 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- WPQTEGCQWDPWTCRLLHGW-LE (SEC ID Nº 313)
Con4-24 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- PDTRQGCQWDPWTCRLYGMW-LE (SEC ID Nº 314)
AC1-Con4 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- TWPQDKCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEC ID Nº 315)
AC3-Con4 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- DKILEECEWDPWTCRILQGW-LE (SEC ID Nº 316)
AC5-Con4 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- AATQEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEC ID Nº 317)
L1 Derived Affinity -Matured Pbs	hAng-2:Tie2 IC ₅₀ (nM)	Peptibody Sequence (SEC ID Nº)
L1-7 (N)	0,03	MGAQ- TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 318)
AC6-L1 (N)	0,03	MGAQ- TNYKPIDEIDATLYEHWILQHS LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 319)
L1-15 (N)	0,04	MGAQ- QKYQPIDEELDKTLYDQFMLQQG LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 320)
L1-2 (N)	0,04	MGAQ- LNFTPPLDELEQTLYEQWTLQQS LEGGGGG-Fc (SEQ 10 NO: 321)
L1-10 (N)	0,05	MGAQ- QKFQPIDELEQTLYEQFMLQQA LEGGGGG-Fc (SEQ 10 NO: 322)
L1-13 (N)	0,05	MGAQ- QEYEPLDEIDETLYNQWNIFHQR LEGGGGG-Fc

Pc derivados de Con4 de afinidad madurada	hAng-2:Tie2 Cl ₅₀ (nM)	Secuencia del pepticuerpo (SEC ID Nº)
		(SEC ID Nº 323)
L1-5 (N)	0,05	MGAQ- VKYKPIDELD~YEQQTFQER LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 324)
L1-C2 (N)	0,05	MGAQ- TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 325)
L1-C3 (N)	0,06	MGAQ- TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 326)
L1-11 (N)	0,07	MGAQ- QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 327)
L1-17 (N)	0,08	MGAQ- VKYKPIDEIDEWLYHQFTLHHQ LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 328)
L1-12 (N)	0,08	MGAQ- YKFrPIDDLEQTLYEQWTLQHV LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 329)
L1-1 (N)	0,08	MGAQ- QNYKPLDELDATI..YEHFIFHYT LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 330)
L1-4 (N)	0,08	MGAQ- VKFKPIDALEQTLYEHWMFQQA LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 331)
L1-20 (N)	0,09	MGAQ- EDYMPIDALDAQLYEQFILUIG LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 332)
L1-22 (N)	0,09	MGAQ- YKFNPMDELEQTLYEELFQHA LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 333)
L1-14 (N)	0,11	MGAQ- SNFMPIDALEQTLYEQFMLQHQ LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 334)
L1-16 (N)	0,11	MGAQ-

Pc derivados de Con4 de afinidad madurada	hAng-2:Tie2 IC ₅₀ (nM)	Secuencia del pepticuerpo (SEC ID Nº)
		QKFQPIDELEETLYKQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 335)
L1-18 (N)	0,16	MGAQ- -QKFMPIDELDEII..YEQFMFQQS LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 336)
L1-3 (N)	0,16	MGAQ- TKFNPIDELEQTLYEQWTLQHQ LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 337)
L1-21 (N)	0,17	MGAQ- IITFQPIDELEETLYYQWLYDQL LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 338)
L1-C1 (N)	0,56	MGAQ- QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 339)
L1-19 (N)	1,26	MGAQ- QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 340)
L1-9 (N)	1,62	MGAQ- SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA LEGGGGG-Fc (SEC ID Nº 341)
Con1 Derived Affinity -Matured Pbs	hAng-2:Tie2 IC ₅₀ (nM)	Peptibody Sequence (SEC ID Nº)
Con1-4 (C)	1,68	M-Fc-GGGGGAQ – SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL-LE (SEC ID Nº 342)
Con1-1 (C)	3,08	M-Fc-GGGGGAQ – AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA-LE (SEC ID Nº 343)
Con1-6 (C)	8,60	M-Fc-GGGGGAQ – GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG-LE (SEC ID Nº 344)
Con1-3 (C)	16,42	M-Fc-GGGGGAQ – APGQRPYDGMLGWPTYQRIV-LE (SEC ID Nº 345)
Con1-2 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ – QTWDDPCMHLGPVTWRCI-LE (SEC ID Nº 346)
Con1-5 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ – FGDKRPLECMFGGPIQLCPR-LE

Pc derivados de Con4 de afinidad madurada	hAng-2:Tie2 Cl ₅₀ (nM)	Secuencia del pepticuerpo (SEC ID Nº)
		(SEC ID Nº 347)
Parent: Con1 (C)	26	MFc-GGGGGAQ – KRPCEEIFGGCTYQ-LE (SEC ID Nº 348)
12-9 Derived Affinity -Matured Pbs	hAng-2:Tie2 IC ₅₀ (nM)	Peptibody Sequence (SEC ID Nº)
12-9-3 (C)	0,81	M-Fc-GGGGGAQ – LQEWC EGVEDPFF FGCEKQR-LE (SEC ID Nº 349)
12-9-7 (C)	0,93	M-Fc-GGGGGA – QMIDYCEGMDDPFfFGCDKQM – LE (SEC ID Nº 350)
12-9-6 (C)	0,95	M-Fc-GGGGGA – QHQEYCEGMEDPFF FGCEYQG-LE (SEC ID Nº 351)
12-9-C2 (C)	1,41	M-Fc-GGGGGAQ – LQDYCEGVQDPFTFGCENQR-LE (SEC ID Nº 352)
12-9-5 (C)	1,56	M-Fc-GGGGGAQ – LLDYCEGVQDPFTFGCENLD-LE (SEC ID Nº 353)
12-9-1 (C)	1,84	M-Fc-GGGGGAQ – GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT-LE (SEC ID Nº 354)
12-9-4 (C)	2,05	M-Fc-GGGGGAQ – AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK-LE (SEC ID Nº 355)
12-9-C1 (C)	2,68	M-Fc-GGGGGAQ – LQDYCEGVEDPFF FGCEKQR-LE (SEC ID Nº 356)
12-9-2 (C)	8,42	M-Fc-GGGGGAQ – KLEYCDGMEDPFrQGCDNQS-LE (SEC ID Nº 357)
Parent: 12-9 (C)	15,00	M-Fc-GGGGGAQ – FDYCEGVEDPFTFGCDNH-LE (SEC ID Nº 358)

Ejemplo 9

5 Seis muestras de pepticuerpos anti-Ang2 se ensayaron para su actividad de unión a huAng2 (R&D Systems, BN012103A) sobre BIACore. La proteína G se inmovilizó a un circuito CM5 de acuerdo con el protocolo de acoplamiento a amina (BIACore Inc.), y los pepticuerpos se inyectaron después sobre una superficie de proteína G para captura (RL - 100 Ru). Para analizar la unión entre entre hAng2 y el pepticuerpo capturado, 0,3 nM a 40 nM de huAng2 se inyectó sobre las superficies del pepticuerpo capturado, y se analizaron sensogramas de unión usando BIAscan 3.0 (BIACore Inc.). La Tabla 8 resume los resultados de este experimento.

Pepticuerpo	Nº de lote	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)
Con4-44 (C)	11702	2,10 E-10	2,90 E +05	5,90 E-05
L1-7 (N)	22102	2,40 E-10	3,70 E +05	8,70 E-05
L1-10 (N)	21302	7,70 E-10	1,50 E +05	1,10 E-04
L1-21 (N)	21802	2,40 E-10	5,60 E +05	1,40 E-04
Con4 (C)	33456-77	3,80 E-10	5,30 E +05	2,00 E-04
2xCon4 (C) 1K	92501	3,40 E-10	4,80 E +05	1,60 E-04

Ejemplo 10ELISA de neutralización

Los medios acondicionados con Ang-2 humana, murino, de cino, y de rata y Ang-1 humana y murina se diluyeron en 5 DMEM/50 µg/ml de BSA como sigue: hAng-2 - dilución 1:64; mAng-2 - dilución 1:64; rat Ang-2 - no diluido; Ang-2 - cino dilución 1 :32; hAng-1 - dilución 1 :4; y mAng-1 - dilución 1:4.

El grado al que cada uno de estos medios acondicionados se diluyó se determinó mediante su capacidad para 10 unirse a hTie2-Fc 1 nM (proporcionado en forma de una molécula de Tie-2-Fc donde la parte de Tie-2 contiene solamente la parte extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI) a 50% de unión 15 que se puede lograr de manera máxima (es decir, meseta). Las placas de microtitulación se revistieron con 100 µl de los medios acondicionados diluidos. Para los ELISA de neutralización de Ang-2, pepticuerpos anti-Ang-2 candidatos se titularon desde 62,5 nM a 0,015 pM en diluciones 4 veces en una solución de PBS que contiene aproximadamente 1% de BSA y aproximadamente Tie-2 1 nM (suministrado en forma de molécula Tie-2-Fc, en la que la parte Tie-2 contiene solamente la porción extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Para los ELISA de neutralización de Ang-2, pepticuerpos anti-Ang-2 candidatos se titularon desde 15 1000 nM a 0,2 pM en diluciones 4 veces en una solución de PBS que contiene aproximadamente 1% de BSA y aproximadamente Tie-1 1 nM (suministrado en forma de molécula Tie-2-Fc, en la que la parte Tie-2 contiene solamente la porción extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI).

Después a cada pocillo se añadió aproximadamente 100 microlitros de la solución del anticuerpo/Tie-2, las placas 20 se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y, después, se lavaron cinco veces en PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Después de lavar, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de anticuerpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., nº de catálogo 557039) hasta una concentración final de 25 aproximadamente 1 microgramo por ml, y las placas se incubaron durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG anti-ratón de cabra-HRP (Pierce Chemical Co., nº de catálogo 31432) a una dilución de 1:10.000 en PBS que contenía aproximadamente 1 por ciento de BSA.

Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, después de lo cual se lavaron 30 cinco veces con PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Después, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato TMB (SIGMA, nº de catálogo T8665) y se dejó que se desarrollara el color azul. Después se leyó la absorbancia a aproximadamente 370 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se muestran en la tabla 9 a continuación.

Tabla 9

Neutralización mediada por pepticuerpos de las interacciones angiopoyetina-Tie2						
	hAng-2	mAng-2	rAng-2	cAng-2	hAng-1	mAng-1
Pepticuerpo	Cl ₅₀ (nM)					
2xCon4 (C)	0,026	0,035	0,024	0,047	3	3,2
Con4 (C)	0,197	0,289	0,236	0,54	200	300
Con4-44 (C)	0,08	0,16	0,22	----	43	----
Con4-40 (C)	0,2	0,27	0,35	----	> 1000	----
L1-7 (N)	0,046	0,063	0,035	0,108	> 1000	> 1000
L1-21 (N)	0,179	0,249	0,204	0,608	> 1000	> 1000
L1-10 (N)	0,06	0,06	0,06	----	> 1000	----

Ejemplo 11

Estudio FCDiseño del estudio

5 Ratones macho CD-1, que pesan 20 - 30 g, se dividieron al azar en cada grupo de tratamiento de pepticuerpo (2xCon4-C, LI-7-N, y LI-21 -N). Los animales un único bolo IV (n = 38/grupo) o una única administración SC de 50 µg de pepticuerpo (n = 34/grupo). Las inyecciones se realizaron mediante la vena de la cola y bajo la piel sobre los hombros para las administraciones IV y SC, respectivamente.

Obtención de muestras de sangre y Procedimientos analíticos

10 Se recogieron muestras de sangre para cada medición de concentración de pepticuerpos de anti-Ang2 antes de la dosis, y a 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 216, 264, 312, y 336 horas después de la administración de la dosis para los grupos SC y N. Se recogieron muestras adicionales a los 5 y 30 minutos después de la dosis para los grupos IV. Se tomaron muestras de sangre de dos animales por punto de tiempo y se sacrificó a los animales después de la obtención de la muestra. Se recogió sangre (aproximadamente 0,50 ml) de una punción cardíaca en tubos separadores de suero de polipropileno microtainer ®. Las muestras se mantuvieron en hielo durante aproximadamente 20 minutos o hasta que se formó coágulo. Se separó el suero de las muestras de sangre mediante centrifugación durante aproximadamente 10 minutos a 2 - 8%, y se almacenó a aproximadamente -70°C hasta que se analizó. Se midieron las muestras usando un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo verificado (TRF) con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 100 ng/ml. Se revistieron las placas de microvaloración NUNC fluoroMaxisor placas con proteína Ang-2 de ratón recombinante. Después las placas se bloquearon con una solución de proteína para reducir la unión no específica. Controles de calidad convencionales, y muestras desconocidas se prepararon en tampón de ensayo de suero de ratón al 10% y se pipeteó en pocillos de placas de microtitulación. Los pepticuerpos se unieron específicamente a la Ang-2 inmovilizada. Después de retirar por lavado cualesquiera de las sustancias no unidas (Kirkegaard y Pery Laboratories Inc.), un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-Humano IgG (H+L) de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) se añadió a los pocillos. Después de una etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpomonoclonal biotinilado no unido se añadió a los pocillos estreptavidina marcada con europio. Después de eliminar por lavado el europio no unido a estreptavidina, el europio unido se liberó de la estreptavidina con solución de ácido acético pipeteado en cada pocillo. Se generó la señal fluorescente y se leyó en el lector fluorométrico de Wallac. El intervalo de ensayo para el análisis de pepticuerpo de anti-Ang-2 en suero de ratón es 0,078 - 5 µg/ml.

Análisis farmacocinético.

30 Los datos medios de concentración-tiempo del compuesto para cada grupo se sometieron a análisis no compartimental usando WinNonlin Professional (Version 3.3, Pharsight Corp., Mountain View, CA). Los tiempos de muestreo nominales se usaron para análisis de PK, a medida que se recogían las muestras dentro del 10% del tiempo nominal. Todos los valores de concentración menores que el valor de LLOQ se fijaron a cero antes del análisis de FC. Se estiman los parámetros FC siguientes:

35 • Se calculó la semivida terminal como

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{K_d}$$

donde K_d era la constante de velocidad de primer orden estimada mediante regresión lineal de la fase de disminución lineal logarítmica terminal.

40 • El área bajo la curva concentración - tiempo ($AUC_{(0-\text{last})}$) se estimó usando el procedimiento trapezoidal lineal/log para el tiempo 0, el tiempo de la última concentración cuantificable (C_{last}).

• El área bajo la curva concentración - tiempo ($AUC_{(0-\text{last})}$) se estimó usando el procedimiento trapezoidal lineal/log para el tiempo 0, el tiempo de la última concentración cuantificable (C_{last}).

$$AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-\text{last})} + \frac{\text{Predicted } C_{\text{last}}}{k_{\text{el}}}$$

45 • La biodisponibilidad absoluta (F) después de la administración SC se calculó como:

$$F = \frac{AUC_{(0-\infty)\text{SC}}}{AUC_{(0-\infty)\text{IV}}} \times 100$$

Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 12

A ratones hembras atípicos se les inyectó por vía subcutánea 1×10^7 células A431 el día de estudio 0. El día 3, el pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C se administró por vía subcutánea a una dosis de 200 µg/ratón/día. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron a intervalos regulares, como se muestra en la figura. . Se observaron diferencias significativas en desarrollo de tumor entre el grupo tratado con pepticuerpo de Ang-2 contra el control de vehículo y pepticuerpo de control ($p < 0,0001$ contra cada control usando ANOVA de medición repetida, con el ensayo post hoc de Scheffé). El tratamiento con este pepticuerpo no tenía efecto significativo sobre los pesos corporales. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 13**10 Curva de crecimiento *In Vitro* de A431**

Las células A431 se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos a 2000 células por pocillo, en 200 µl de DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS). Después el medio se aspiró 16 horas después de la siembra. A continuación se aspiró el medio 16 horas después de la siembra. Después se volvió a añadir lo siguiente en los pocillos y se realizó por triplicado: 100 µl por pocillo de DMEM, 10% de FBS, 1 mg/ml de control de pepticuerpo negativo 4883 o pepticuerpo TN8-Con4. Se repitieron las mismas realizaciones sobre 5 placas. Se aspiró el medio de una placa 24, 48, 72, 96, y 120 horas después de tratamiento. Después se añadieron 100 µl de ácido trifluoroacético al 10% (TCA) por pocillo, y las placas se almacenaron a 4°C. Se recogieron todas las placas cuando la última placa había estado en TCA al 10% durante un mínimo de 4 horas. TCA al 10% se sacó con agitación, y se enjuagaron los pocillos 5 veces con agua corriente. Las células se tiñeron con 100 µl de 0,4% de sulforrodamina B (Sigma S-9012) en ácido acético al 1% (Sigma A-6283) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después se lavaron 5 veces con ácido acético al 1%. Después las placas se secaron al aire. El tinte se solubilizó con 300 µl de 120 mM de Tris no tamponado ($pH > 10$) durante 2 horas en un agitador rotatorio. Después se leyó la densidad óptica (DO) a 540 nm en un lector de placas de microtitulación. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 14

25 A ratones hembras atípicos se les inyectó por vía subcutánea 2×10^6 células Colo-205 más Matrikel (2:1) el día del estudio 0. El día 3, los pepticuerpos de Ang-2 L1-7-N, L1-21-N, Con4-C, y 2xCon4-C se administraron por vía subcutánea a la dosis de 14 µg/ratón, dos veces a la semana. Se administró anticuerpo Ab536 Anti-Ang- 2, 47 µg/ratón, tres veces a la semana, como un control positivo. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron a intervalos regulares.

30 . Se observaron diferencias significativas en desarrollo de tumor entre cada uno del grupo tratado con pepticuerpo de Ang-2 contra el control de vehículo y pepticuerpo de control ($p < 0,0001$ contra cada control usando ANOVA de medición repetida, con el ensayo post hoc de Scheffé). El tratamiento con estos pepticuerpos no tenía efecto significativo sobre los pesos corporales (resultados no mostrados). Los resultados se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 15

35 A ratones hembras atípicos se les inyectó por vía subcutánea 2×10^6 células Colo-205 más Matrikel (2:1) el día de estudio 0. El día 3, el pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C se administró por vía subcutánea las dosis de 14, 2,8 y 0,56 µg/ratón, dos veces a la semana. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron a intervalos regulares, como se ha mostrado. Se observaron diferencias significativas en desarrollo de tumor entre las dos dosis más altas del grupo tratado con pepticuerpo de Ang-2 contra el control de vehículo y pepticuerpo de control ($p = 0,003$ para la dosis intermedia y $p < 0,0001$ para la dosis alta, usando ANOVA de medición repetida, con el ensayo post hoc de Scheffé). El tratamiento con estos pepticuerpos no tenía efecto significativo sobre los pesos corporales. La línea de puntos representa el total n del grupo, de 10 a 9 ratones, debido a la muerte de un ratón por razones desconocidas. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 16**45 Pepticuerpos Anti-Ang-2 contra Tumores de aloinjerto de Colo-205**

A ratones hembras atípicos se les inyectó por vía subcutánea 2×10^6 células Colo-205 más Matrikel (2:1) el día de estudio 0. El día 3, el pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C o pepticuerpo de control se administraron por vía subcutánea las dosis de 350, 2,8 y 0,56 µg/ratón, dos veces a la semana. Los tumores de los grupos tratados con pepticuerpo control (como se describe en la Tabla 5) se recogieron o bien el día 14 (control coincidente de tamaño) o el día 18 (control coincidente de tiempo). Los tumores del grupo tratado con 2xCon4(C) se recogieron después el día 18. Se registraron los volúmenes de tumor a intervalos regulares como se muestra. Se observaron diferencias significativas en el crecimiento de tumor entre el grupo coincidente de control coincidente en tiempo y el grupo tratado con 2xCon4(C) ($p = 0,0154$ mediante ANOVA de medición repetida, con ensayo post hoc de Scheffé). El tratamiento con estos pepticuerpos no tuvo ningún efecto significativo sobre los pesos corporales.

55 Los tumores preparados para análisis de formación de imágenes se biseccionaron en forma de corona y una mitad se congeló de manera ultrarrápida en OCT (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA). Las crio secciones se tiñeron

de manera inmunológica usando anti-ratón CD31 (nº de catálogo 553370, BD PharMingen, San Diego, CA) a 2 µg/ml, con DAB como el cromógeno. Las secciones de tumor se fotografiaron de manera digital a un aumento de objetivo 20X. Se capturaron cuatro campos de "punto de acción" por tumor, con diez tumores por grupo de tratamiento. Se usó un sistema de análisis de imagen MetaMorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) para el umbral para los vasos sanguíneos teñidos con CD31 dentro de las imágenes. Las áreas de tinción positiva de CD31 se expresaron como una relación del tejido tumoral total dentro de cada campo. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 17

10 A ratones hembras atílicas se les inyectó por vía subcutánea 2×10^6 células Colo-205 más Matrigel (2:1) el día del estudio 0. El tratamiento con 350 µg/ratón, s. c dos veces a la semana, del pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C, o pepticuerpo de control equivalente comenzado o bien el día de estudio 3, 10 o 15. Se registraron los volúmenes del tumor y pesos corporales a intervalos regulares. Se observaron diferencias significativas en desarrollo de tumor entre el grupo tratado con pepticuerpo de Ang-2 contra el control de vehículo y pepticuerpo de control ($p = 0,089$ para el grupo del día 15 y $p < 0,0001$ para los grupos de los días 3 y 10, usando ANOVA de medición repetida, con ensayo post hoc de Scheffe). El tratamiento con estos pepticuerpos no tenían efecto significativo sobre los pesos corporales. Los resultados se muestran en la Figura 8 (pesos corporales no mostrados).

Ejemplo 18

20 Se obtuvo un resumen de las tasas de respuesta completa (RC) usando el anticuerpo Ab536 a 47 µg/ratón hembra desnudo, administrado por vía intraperitoneal tres veces a la semana, o con pepticuerpo 2xCon4(C), proporcionado de manera subcutánea en programas de dosificación múltiple en diferentes estudios de larga duración (2,10 semanas de dosificación) tanto en los modelos de xenoinjerto A431 como de Colo-205. RC, como se usa en el presente documento, se refiere a un resultado en el que no queda ningún tumor medible después del tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Ejemplo 19

25 a) Combinación de Pb con taxotere en el modelo de tumor Colo-205

A ratones hembras atílicas se les inyectó por vía subcutánea 2×10^6 células Colo-205 más Matrigel (2:1) el día del estudio 0. El día de estudio 14, se comenzaron los tratamientos a) con 350 µg/ratón, s. c dos veces a la semana, del pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C, b) 20 mg/kg de qwx3 i. p. de taxotere, o c) una combinación de ambos. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron a intervalos regulares. Se observaron diferencias significativas en el crecimiento de tumor entre todos los grupos de tratamiento contra el control de vehículo ($p < 0,0001$ usando ANOVA de medición repetida, con ensayo post hoc de Scheffe). Además, el grupo de terapia de combinación era diferente de manera significativa a cualquiera de los agentes de monoterapia ($p < 0,0001$ contra 2xCon-4 y $p = 0,0122$ frente a taxotere). La línea de puntos representa el total n del grupo, de 10 a 9 ratones, debido a la muerte de un ratón por razones desconocidas. El tratamiento con estos pepticuerpos no tenían efecto significativo sobre los pesos corporales. Los resultados se muestran en la Figura 10a.

b) Combinación de Pb con 5-FU en el modelo de tumor de Colo-205

A ratones hembras atílicas se les inyectó por vía subcutánea 2×10^6 células Colo-205 más Matrigel (2:1) el día del estudio 0. El día de estudio 14, se comenzaron los tratamientos a) con 350 µg/ratón, s. c dos veces a la semana, del pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C, b) 50 mg/kg de qwx5 i. p. de 5-FU, o c) una combinación de ambos. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron a intervalos regulares, como se ha mostrado.

40 Se observaron diferencias significativas en el crecimiento de tumor entre todos los grupos de tratamiento contra el control de vehículo ($p < 0,0001$ usando ANOVA de medición repetida, con ensayo post hoc de Scheffe). Además, el grupo de terapia de combinación era diferente de manera significativa a cualquiera de los agentes de monoterapia ($p < 0,0375$ frente a 2xCon-4 y $p = 0,0453$ frente a 5-FU). Se observó una reducción transitoria en el peso corporal del grupo tratado con 5-FU (18% en el día de estudio 20) así como con el grupo de terapia de combinación (16% en el estudio del día 20), seguido de una recuperación completa de los pesos corporales. Los resultados se muestran en la Figura 10b.

Ejemplo 20

Modelo de artritis de adyuvante

50 Ratas macho de Lewis (120 - 130 g, Charles River, Wilmington MA) se alojaron dos por jaula tapadas con filtro en una habitación controlada ambientalmente (temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa $50 \pm 20\%$) e un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Los animales se alimentaron mediante un pienso de roedor comercial (Formulación 8640; Tek Lab, Madison, WI) y recibieron agua corriente purificada por filtro a voluntad. Los contenidos en calcio y fósforo de dieta eran 1,2% y 1 0%, respectivamente.

55 La artritis por adyuvante se indujo mediante una única inyección de 0,5 mg inactivada por calor. Mycobacterium

5 tuberculosis H37Ra (Difco Laboratories, Detroit, MI) suspendido en 0,05 ml de aceite de parafina (Crescent Chemical Co., Hauppauge, NY) por vía intradérmica en la base de la cola. La aparición química de la artritis fue el día 9 como se indica mediante la inflamación de la para trasera y dificultades ambulatorias. Excepto en el grupo tratado con 2xCon4(c) (que se trató el día 1 después de inmunización), se proporcionaron tratamientos en forma de inyecciones subcutáneas diariamente comenzando el día 9 después de inmunización (antes de la aparición de artritis) y continuando a lo largo del día 18.

Control clínico de la artritis de adyuvante

10 La progresión de la inflamación se determinó clínicamente mediante la medición intermitente del volumen de la pata trasera usando plethysmografía en agua de acuerdo con los procedimientos descritos por Beige y col., Cellular Molec Life Sci., 57:1457-1470 (2000). La inhibición de la inflamación de la pata trasera se calculó basándose en el área 15 bajo la curva (AUC) usando la regla trapezoidal de acuerdo con la fórmula:

$$[(1 - (AAd \text{ tratada}) - \text{normal}) / (AAd \text{ sin tratar} - \text{normal})] \times 100$$

15 Además, se determinó el peso corporal total diariamente durante el régimen de tratamiento de 9 días como un punto final suplementario debido a que la pérdida de peso corporal se ha mostrado que es paralelo a la progresión de la inflamación de las articulaciones en este modelo de artritis. Se sacrificaron los animales en CO₂ el día 18.

20 La pérdida de densidad mineral ósea (DMO) se examinó en la necropsia (día 18 después de la inmunización). Se retiraron las patas traseras en la línea de pelo (justo proximal al tobillo (corvejón)), sumergido en 70% de etanol, y después se exploraron en orientación horizontal usando un densitómetro de rayos X de haz de ventilación (Modelo QDR-4500A; Hologic, Waltham, MA). Véase Feige y col., supra. Después de la exploración, se centró una caja rectangular (29 x 25 mm) en el calcáneo se posicionó para delinear el sitio a analizar, y los algoritmos patentados (software Hologic) área de hueso calculada, contenido mineral óseo, y densidad mineral ósea.

25 Todos los resultados se expresaron como valor medio ± desviación estándar. Se ha utilizado un valor p 0,05 para definir las diferencias significativas entre los grupos. Se realizó un test de Krushal-Wallis ANOVA y Mann-Whitney U usando un software estadístico comercial (Statsoft v3.0; Statsoft, Tulsa, OK) con los datos clínicos (variables continuas).

Los resultados se muestran en la Figura 11a, 11b, and 11c, respectivamente.

Ejemplo 21

Modelo de angiogénesis corneal

Efecto de CON4(C) sobre angiogénesis inducida por VEGF en ratas

30 Se evaluó el pepticuerpo de Ang-2 CON4(C) en el modelo corneal de angiogénesis en ratas. Se indujo angiogénesis mediante el implante de un disco de nylon sumergido en VEGF- (o control BSA) en el estroma corneal (n = 8/grupo). Se administró el pepticuerpo TN8CON4-C mediante inyección subcutánea a 1,0 ó 0,1 mg/rata/día durante siete días. Los otros dos grupos de animales se trataron con la misma dosis de pepticuerpo de control negativo 4883. Todos los grupos se trataron previamente con una sola dosis de carga de o bien 3,0 ó 0,3 mg que tenía tres veces la dosis de mantenimiento de 1,0 ó 0,1 mg (véase la figura). Después de siete días de tratamiento, se determinaron dos puntos finales vasculares a partir de cada imagen digital de la córnea de rata: el número de vasos que intersectan el punto medio entre el disco y el limbo, y el área de vasos sanguíneos. El tratamiento con TN8CON4-C inhibía de manera significativa la angiogénesis inducida por VEGF de una manera dependiente de la dosis (p < 0,04), mientras que el tratamiento con el control de pepticuerpo no tenía efecto significativo sobre cualquier punto final. No había evidencia de toxicidad excesiva basada en los pesos corporales de los animales tratados. Los resultados se muestran en la Figura 12.

Ejemplo 22

Mapeo de epítopos

45 Se clonaron proteínas de Ang-2 (hAng-2) humanas de longitud completa (aminoácidos 1 - 495), N- terminal (aminoácidos 1 - 254) y C-terminal (aminoácidos 255-495) en un vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV -con etiquetas C-terminal 6xHis. Las tres construcciones resultantes más un control de vector se expresaron de manera transitoria en las células 293T. Después se recogió el medio acondicionado de las células transfectadas, y el nivel de expresión de Ang-2 en el medio se estimó mediante ELISA de anti-6xhis y transferencia de Western.

50 El epítopo de unión de anticuerpos anti-Ang-2 y pepticuerpos se determinó por su capacidad de unir las tres versiones de hAng-2 humano mediante ELISA de acuerdo con el siguiente protocolo: una placa de alta unión de 96 pocillos se revistió con 100 µl de medio acondicionado por pocillo, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se aspiró el medio acondicionado, y se bloqueó la placa con 200 µl por pocillo de 5% de BSA en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de bloqueo se aspiró después. Se añadieron 100 µl por pocillo de anticuerpo, pepticuerpo, o Tie2-Fc a 1 µg/ml en 1% de BSA en PBS, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los

pocillos se lavaron 4 veces con 200 μ l de 0,1% de Tween en PBS. Se añadieron 100 μ l por pocillo de IgG anti-humanA de cabra o IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP, y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Los pocillos se lavaron 4 veces con 200 μ l de 0,1% de Tween en PBS 4 veces. Se añadieron después 100 μ l por pocillo de sustrato de TMB. Se leyó la DO a 370 nm.

5 Los resultados se muestran en la Figura 13a, 13b, y la Figura 13c.

Ejemplo 23

Debido a ciertas limitaciones de sensibilidad inherentes en el ensayo de BiaCore, también se evaluó la afinidad de unión usando un ensayo Sepidyne KinExA.

10 La unión de 2xCON4-C (Pb5714) a huAng-2 se ensayó sobre KinExA (Sapidyne, Boise, ID). Se revistieron previamente perlas Reacti-Gel 6x (Pierce, Rockford, IL) con huAng-2 y se bloquearon con BSA. Muestras de 15 2xCON4-C 10 pM y 30 pM se incubaron con diversas concentraciones (0,3 pM - 3 nM) de huAng-2 a temperatura ambiente durante 8 horas antes del desarrollo a través de perlas revestidas con huAng-2. La cantidad de pepticuerpo unido a las perlas se cuantificó mediante anticuerpo anti-humano de cabra - Fc marcado con (Cy5) fluorescente (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). La señal de unión es proporcional a la concentración del pepticuerpo libre en equilibrio.

La constante de equilibrio de disociación (K_D) se obtuvo a partir de regresión lineal de las curvas de competición usando un modelo de unión homogéneo de un sitio de curva dual (software KinExTM). Después se determinó que la K_D que era aproximadamente 2 pM para la unión a 2xCON4-C con huAng-2.

20 Como se muestra en la figura 14, usando el pepticuerpo 2xCon4 de ensayo de KinExA se mostró que tenía -2 pM de afinidad para hAng-2.

Ejemplo 24

Péptidos pegilados

El péptido L1-7 se sintetizó con un sintetizador 431 ABI usando un protocolo de acoplamiento estándar y doble acoplamiento del residuo 14 (met) al resto N- term (Cys), numerando desde el extremo N al extremo C.

25 Conjugación de péptido L1-7 con Metoxi-poli(etilen glicol)-maleimida; PM: 5 KDa: denominado "mPEG5K-(Péptido L1-7)"

Una solución de 0,8 mg de Péptido L1-7 en 400 μ l de tampón 1 (20 mM de fosfato, 5 mM de EDTA, pH 6,5) se trató con 13,5 mg de metoxi-poli(etilen glicol)-maleimida (PM = 5 KDa; Shearwater Corp.); 0,27 ml de una solución de 50,0 mg/ml en tampón 1. La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante toda una noche, después se diluyó con 1,6 ml de tampón A (20 mM de Tris clorhidrato, pH 7,2) y se dializó en un módulo Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) frente al mismo tampón. La mezcla de reacción dializada se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico sobre una columna de 1,0 ml HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). El pico de producto se eluyó en dos fracciones de 1,0 ml mediante un gradiente entre 100% de tampón A y 100% de tampón B (tampón A + 0,5 M NaCl) sobre 40 volúmenes de columna. Las fracciones de producto combinadas se concentraron hasta 250 μ l conteniendo 0,23 mg de proteína/ml con un dispositivo de Microsep 1 K Centrifugal (Pall Life Sciences).

Conjugación de Péptido L1-7 con 1,11-bis-maleimidotetraetileneglicol; denominado "PE04(Péptido L1-7)₂"

Una solución de 1,0 mg de Péptido L1-7 en 500 μ l de tampón 1 (20 mM fosfato, 5 mM EDTA, pH 6,5) se trató con 0,0375 mg de 1,11-bis-maleimidotetraetileneglicol (Pierce) (0,375 ml de una solución 0,1 mg/ml en tampón 1). La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante 3,33 horas, después se dializó en un módulo Slide-A Lyzer (3500 MWCO, Pierce) contra tampón A (20 mM Tris clorhidrato, pH 7,2). La mezcla de reacción dializada se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico sobre una columna de 1,0 ml HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). El pico de producto dimérico se eluyó en tres fracciones de 1,0 ml mediante un gradiente entre 100% de tampón A y 100% de tampón B (tampón A + NaCl 0,5 M) sobre 40 volúmenes de columna. Las fracciones de producto combinadas se concentraron hasta 550 μ l conteniendo 0,12 mg de proteína/ml con un dispositivo de Microsep 1 K Centrifugal (Pall Life Sciences).

Conjugación de péptido L1-7 con poli(etilen glicol)-maleimida: PM 3,4 KDa: denominado "PEG3.4K(Péptido L1-7)₂"

Una solución de 3,0 mg de Péptido L1-7 en 1,5 de tampón 1 (20 mM de fosfato, 5 mM de EDTA, pH 6,5) se trató con 1,125 mg de metoxi-poli(etilen glicol)-maleimida (PM = 5 KDa; Shearwater Corp.); 0,563 ml de una solución de 2,0 mg/ml en tampón 1. La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante toda una noche, después se diluyó con 1,6 ml de tampón A (20 mM de Tris clorhidrato, pH 7,2) y se dializó en un módulo Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) contra tampón A (Tris clorhidrato 20 mM, pH 7,2). La mezcla de reacción dializada se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico sobre una columna de 5,0 ml HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). El pico de producto se eluyó en tres fracciones de 3,0 ml mediante un gradiente entre 100% de tampón A y 100% de tampón B (tampón A + 0,5 M NaCl) sobre 40 volúmenes de columna. Las fracciones de producto combinadas se concentraron hasta 850 μ l conteniendo 0,24 mg de proteína/ml con dos dispositivos de Microsep 1 K

Centrifugal (Pall Life Sciences).

Los resultados de la espectroscopía de masas MALDI-TOF fueron los siguientes:

Nº de muestra	Identidad	EM Exp.	EM Obs.
1	L1-7 (Péptido noPEGilado)	3.545	3.538,7
2	mPEG5K-(Péptido L1-7)	8.500	8.851
3	PE04 (Péptido L1-7) ₂	7.443	7.446,29
4	PEG3.4K (Péptido L1-7) ₂	10.55	10.552 6.882,61 3.550,13

- 5 Se apreciará que el subíndice "2" para el PEG3.4K(péptido L1-7) y PE04(péptido L1-7) indica que existen dos péptidos por cadena de polímero, uno localizado en cada extremo del polímero.

Determinación de la Cl_{50} (nM)

10 La Cl_{50} para la inhibición de la interacción hAng2:hTie2-Fc para el L1-7 libre y los péptidos PEGilados de determinaron mediante el ELISA de Neutralización como se describe en el Ejemplo 2. Para el ELISA de Neutralización, se prepararon placas de microvaloración a las que se unió polipéptido Ang-2 estaba unido como se ha descrito en el Ejemplo 2 para el ELISA de Afinidad. Los péptidos anti-Ang-2, L1-7 PEGilados y libres candidatos se titularon desde 1000 nM a 0,2 pM en diluciones 4 veces en una solución de PBS que contiene aproximadamente 1% de BSA y aproximadamente Tie-2 1 nM (suministrado en forma de molécula Tie-2-Fc, en la que la parte Tie-2 contiene solamente la porción extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Despues a cada pocillo se añadió aproximadamente 100 microlitros de la solución del anticuerpo/Tie-2, las placas 15 se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y, después, se lavaron cinco veces en PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Despues de lavar, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de anticuerpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., nº de catálogo 557039) hasta una concentración final de 20 aproximadamente 1 microgramo por ml, y las placas se incubaron durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG anti-ratón de cabra-HRP (Pierce Chemical CO., nº de catálogo 31432) a una dilución de 1:10.000 en PBS que contenía aproximadamente 1 por ciento de BSA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, después de lo cual se lavaron cinco veces con PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Despues, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato TMB (descrito 25 anteriormente) y se dejó que se desarrollara el color. Despues se leyó la absorbancia a aproximadamente 370 nm en un espectrofotómetro.

Los péptidos L1-7 (C-GGGGG-AQ-TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG-LE) (SEC ID Nº 359) incluían: Cisteína N-terminal para acoplamiento a PEG; y un enlazador 5Gly. Las secuencias flanqueantes AQ y LE estaban presentes tanto en el clon del fago original como en el pepticuerpo. Los resultados de la inhibición de la Cl_{50} de hAng-2:Tie2 fueron los siguientes:

30

Péptido	Cl_{50} (nM)
Péptido L1-7	0,49
mPEG5K-(Péptido L1-7)	11,7
PE04(Péptido L1-7) ₂	0,064
PEG3.4K(Péptido L1-7) ₂	0,058

Ejemplo 25

35 Se estudió el efecto del pepticuerpo de Ang-2 2xCon4(C) sobre la arthritis adyuvante de rata, se administró comenzando en el momento de la inmunización (día 0) o inmediatamente antes del inicio de los síntomas clínicos de arthritis (día 8). El pepticuerpo de Ang-2 2xCon4(C) también se estudió en combinación con un inhibidor de TNF PEGilado, pegasunercept (PEG sTNF-R1).

Se obtuvieron ratas Lewis macho (200-250 g) de Charles River (Wilmington, MA). La arthritis se indujo usando una inyección intradérmica en la base de la cola de 0,5 mg de Mycobacterium tuberculosis destruida con calor H37Ra, termed "MTb" (Difco Laboratories, Detroit, MI) suspendidos en 0,05 ml de aceite de parafina (Crescent Chemical Co.,

Hauppauge, NY) el día 0. Los tratamientos de PEG sTNF-R1 (30 mg/ml, administrados a 1 mg/kg, el pepticuerpo 2xCon4(C) (30,8 mg/ml, administrado a 1 mg/rata) o vehículo (PBS) se administraron por vía subcutánea como se indica en la tabla siguiente.

Nº de Grupo	MTb	Grupo	PEG s TNF-R1 o PBS	2xCon4(C) o PBS	N
1	-	Control Normal	-	-	6
2	+	Artritis Control	-	-	6
3	+	PBS Control	PBS día 0-17	PBS día 0-17	6
4	+	PEG sTNF-R1	PEGsTNF-R1 día 0-17	PBS día 0-17	6
5	+	2xCon4(C)	PBS día 0-17	2xCon4(C) día 0-17	6
6	+	PEG sTNF-R1 + 2xCon4 (C)	PEGsTNF-R1 día 0-17		6
7	+	PBS Control	PBS día 8-17	PBS día 8-17	6
8	+	PEG sTNF-R1	PEGsTNF-R1 día 8-17	PBS día 8-17	6
9	+	2xCon4(C)	PBS día 8-17	2xCon4(C) día 8-17	6
10	+	PEG sTNF-R1 + 2xCon4 (C)	PEG sTNF-R1 día 8-17	2xCon4(C) día 8-17	6
11	+	PEG sTNF-R1 + 2xCon4 (C)	PEG sTNF-R1 día 8-17	2xCon4(C) día 0-17	6

5 Se escogió una dosis que no sea máxima eficaz de 1 mg/kg de PEG sTNF-R1 con el fin de permitir la evaluación de posibles efectos aditivos sobre la terapia con el pepticuerpo 2xCon4(C). El volumen de la pata trasera se evaluó clínicamente mediante medición diaria del volumen de la pata trasera usando pleismografía de agua (Feige y col., Cell Mol Life Sci, 57:1457-1470 (2000)). La inhibición de la inflamación de la pata trasera se calculó basándose en el área bajo la curva (AUC) de acuerdo con la fórmula:

$$[(\text{AUC AAd artrítica} - \text{AUC AAd tratada}) / \text{AUC AAd artrítica}] \times 100$$

Se determinó el peso corporal total diariamente desde el día 9 al día 18 como un punto final suplementario debido a que la pérdida de peso corporal se ha mostrado que es paralelo a la progresión de la inflamación de las articulaciones en este modelo de artritis.

15 En la Figura 16, los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar. Se ha utilizado un valor p 0,05 para definir las diferencias significativas entre los grupos. Se realizó un test de Krushal-Wallis ANOVA y Mann-Whitney U sin ajuste por multiplicidad del ensayo con los datos clínicos (variables continuas).

20 Peso corporal: Se administra a los grupos el pepticuerpo 2xCon4(C) o PEG sTNF-R1 solo por algún periodo de tiempo perdido o no ganó peso durante el experimento. Los animales a los que se administró terapia de combinación con el pepticuerpo 2xCon4(C) y PEG sTNF-R1 desde los días 8-17 mantuvieron el peso, no ganaron. No obstante, los animales artríticos que recibieron el pepticuerpo 2xCon4(C) los días 0-17 junto con PEG sTNF-R1 administrado durante el curso de tiempo (días 0-17 o días 8-17) ganaron peso durante el experimento.

Los resultados se muestran en las Figuras 15, 16, y 17.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> AMGEN INC.
 <120> AGENTES DE UNIÓN ESPECÍFICO DE LA ANGIOPOYETINA-2 HUMANA
 <130> A-801C
 <140> PENDIENTE DE ASIGNACIÓN
 <141> 2004-04-08
 30 <150> US 10/410.998
 <151> 2003-04-09
 <160> 359
 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptidos de unión a Ang-2
 <400> 1

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Met Trp Gly Gly Cys Asn Tyr Asp
 1 5 10

10 <210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Péptidos de unión a Ang-2
 <400> 2

His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Trp
 1 5 10

20 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptidos de unión a Ang-2

25 <400> 3

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln
 1 5 10

30 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptidos de unión a Ang-2
 <400> 4

Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met
 1 5 10

35 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Polipéptidos de unión a Ang-2

<400> 5

Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp
1 5 10 15

5 Asn His

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Polipéptidos de unión a Ang-2

<400> 6

Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe
1 5 10 15

Thr Phe Gln Gln
20

15 <210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptidos de unión a Ang-2

<400> 7

Gln Tyr Gly Cys Asp Gly Phe Leu Tyr Gly Cys Met Ile Asn
1 5 10

25 <210> 8

<211> 67

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

30 <400> 8

acaaaacaaac atatgggtgc acagaaagcg gcccggaaaaa aactcgaggg tggaggcggt 60
ggggaca 67

35 <210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 9

ggtcattact ggaccggatc 20

5 <210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <223> Oligonucleótido

<400> 10

cgtacaggtt tacgcaagaa aatgg 25

15 <210> 11
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

20 <400> 11

tttggat ccattactcg agttttttg cggccgctt ctgtgcacca ccacctccac 60
ctttac 66

25 <210> 12
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Xaa = Fc

<400> 12

Met Gly Ala Gin Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu
1 5 10 15

Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
20 25 30

35

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Peptiduero capaz de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature

5 <222> (29)..(29)

<223> Xaa = Fc

<400> 13

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

10 <210> 14

<211> 51

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Peptiduero capaz de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> Xaa = Fc

20 <400> 14

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser
 20 25 30

Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Gly Xaa
 50

<210> 15

<211> 60

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Peptiduero capaz de unirse a la Ang-2

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (60)..(60)

<223> Xaa = Fc

<400> 15

Met Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu
 1 5 10 15

Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe
 35 40 45

Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly xaa
 50 55 60

<210> 16
 <211> 56
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (56)..(56)
 <223> xaa = Fc
 <400> 16

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro
 20 25 30

Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln
 35 40 45

Leu Glu Gly Gly Gly Gly xaa
 50 55

15 <210> 17
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)

25 <223> xaa = Fc
 <400> 17

Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu
 1 5 10 15

His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly xaa
 20 25

<210> 18

<211> 45

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (45)..(45)

<223> xaa = Fc

<400> 18

Met Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Ala Thr Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser
 20 25 30

Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly xaa
 35 40 45

15

<210> 19

<211> 62

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (62)..(62)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 19

Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu
 1 5 10 15

His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser
 20 25 30

Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro
 35 40 45

Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly xaa
 50 55 60

30 <210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

<400> 20

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
1 5 10 15

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu
20 25 30

10

<210> 21

<211> 53

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

20 <223> Xaa = Fc

<400> 21

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys
20 25 30

Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr
35 40 45

Phe Gln Gln Leu Glu
50

25 <210> 22

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 22

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
 35 40 45

Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu
 50 55

<210> 23

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 23

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp
 1 5 10 15

Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 20 25

15 <210> 24

<211> 47

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 24

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln
 20 25 30

Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 35 40 45

- 5 <210> 25
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 25
- Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp
 1 5 10 15
- Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser
 20 25 30
- Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu
 35 40 45
- Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 50 55 60
- 15 <210> 26
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (75)..(75)
 <223> Xaa = Fc
 25 <400> 26

Met Gly Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
 20 25 30

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly xaa
 65 70 75

<210> 27

<211> 72

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 27

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys
 20 25 30

Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr
 35 40 45

Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro
 50 55 60

Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 65 70

15

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Xaa = Fc

<400> 28

Met	Gly	Ala	Gln	Phe	Asp	Tyr	Cys	Glu	Gly	Val	Glu	Asp	Pro	Phe	Thr
1				5				10						15	

Phe	Gly	Cys	Asp	Asn	His	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	xaa	
1.			20				25					30	

5

<210> 29

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

15 <223> Xaa = Fc

<400> 29

Met	Gly	Ala	Gln	Gln	Tyr	Gly	Cys	Asp	Gly	Phe	Leu	Tyr	Gly	Cys	Met
1				5				10					15		

Ile	Asn	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	xaa	
		20						25	

20 <210> 30

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 30

Met	Gly	Ala	Gln	Lys	Arg	Pro	Cys	Glu	Glu	Met	Trp	Gly	Gly	Cys	Asn
1				5				10					15		

Tyr	Asp	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	xaa	
		20						25	

30

<210> 31

<211> 26

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Peptiduero capaz de unirse a la Ang-2

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 31

Met Gly Ala Gln His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys
 1 5 10 15
 His Trp Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

10 <210> 32
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Peptiduero capaz de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa = Fc
 20 <400> 32

Met Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr
 1 5 10 15
 Tyr Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

25 <210> 33
 <211> 784
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica peptidueros capaces de unirse a la Ang-2
 <400> 33

atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc 60
 actttccagc agctcgaggg tggaggcggt ggggacaaaa ctcacacatg tccacacctgc 120
 ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gttttcctct tccccccaaa acccaaggac 180
 accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtgacgt gagccaccaa 240
 gaccctgagg tcaagttcaa ctggcacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 300
 aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 360
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 420
 gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 480
 accctgcccc catccccggg tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc 540
 aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatggca gccggagaac 600
 aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttcct ctacagcaag 660
 ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACgtct tctcatgctc cgtgatgcat 720
 gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaaataatgg 780
 atcc 784

<210> 34

<211> 768

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<400> 34

atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag 60
 cagctcgagg gtggaggcggt tggggacaaaa actcacacat gtccacacctg cccagcacct 120
 gaactcctgg ggggaccgtc agtttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg 180
 atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtgacgt tgagccacga agaccctgag 240
 gtcaagttca actggcacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 300
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 360
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 420
 gagaaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgtaa caccctgccc 480
 ccatccccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 540
 tatcccagcg acatgcgcgt ggagtggag agcaatggc agccggagaa caactacaag 600
 accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tcccttctcc tctacagcaa gtcaccgtg 660
 gacaagagca ggtggcagca gggAACgttc tctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 720
 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaataa 768

10

<210> 35

<211> 834

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

5 <400> 35

atgaaattca	acccgctgga	cgaactggaa	gaaaactctgt	acgaacagtt	cactttccag	60
cagggatccg	gttctgctac	tggtggttcc	ggctccaccg	caagctctgg	ttcaggcagt	120
gcgactcatc	tcgagggtgg	aggcggtgg	gacaaaactc	acacatgtcc	accttgccca	180
gcacctgaac	tcctgggggg	accgtcagtt	ttcctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	240
ctcatgatct	cccgacccc	tgaggtcaca	tgcgtggtgg	tggacgtgag	ccacgaagac	300
cctgaggtca	agttcaactg	gtacgtggac	ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	360
ccgcgggagg	agcagtacaa	cagcacgtac	cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	420
caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaag	tgcaagggtct	ccaacaaagc	cctcccagcc	480
cccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	540
ctgccccat	cccgatgatc	gctgaccaag	aaccaggatca	gcctgacctg	cctggtcaaa	600
ggtttctatc	ccagcgacat	cgcgtggag	tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	660
tacaagacca	cgcctcccg	gctggactcc	gacggctcct	tcttcctcta	cagcaagctc	720
accgtggaca	agagcagggt	gcagcagggg	aacgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	780
gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	ctctccctgt	ctccggtaa	ataa	834

<210> 36
 <211> 861

10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <400> 36

atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc 60
 actttccagc agggtgtgg tggtgtggc ggtggtaagt tcaacccact ggatgagctg 120
 gaagagactc tgtatgaaca gttcaacttc cagcaactcg agggtggagg cggtggggac 180
 aaaactcaca catgtccacc ttgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtttc 240
 ctctcccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 300
 gtggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtt cgtggacggc 360
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 420
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 480
 aaggctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 540
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccccattccc gggatgagct gaccaagaac 600
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgcacatcgc cgtggagtgg 660
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 720
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 780
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagccctc 840
 tccctgtctc cgggtaaata a 861

<210> 37

<211> 849

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<400> 37

atggaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaaactctgt acgaacagtt cactttccag 60
 cagggtgtgg tgggtggcgg tggtaagttc aacccactgg atgagctgga agagactctg 120
 tatgaacagt tcactttcca gcaactcgag ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca 180
 tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtttcctt cttccccca 240
 aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtgac 300
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 360
 aatgccaaga caaagcccg gggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 420
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaggagt acaagtgcac ggtctccaa 480
 aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggca gccccgagaa 540
 ccacaggtgt acaccctgccc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 600
 acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 660
 cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtctgg actccgacgg ctcccttctc 720

	ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc aggtggcagc agggAACgt cttctcatgc	780
	tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agaggctctc cctgtctccg	840
	ggtaaataa	849
	<210> 38	
	<211> 759	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2	
	<400> 38	
	atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacccatgga cttgcgaaca catgctcgag	60
	ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg	120
	gggggaccgt cagtttcctt cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg	180
	acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaaggttc	240
	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg gggaggagcag	300
	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
	ggcaaggagt acaagtgc aa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	420
	atctccaaag ccaaaggggca gccccagagaa ccacagggtt acaccctgcc cccatcccg	480
	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
	gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
	cccggtctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc	660
	agggtggcagc agggAACgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctctc gcacaaccac	720
10	tacacgcaga agaggctctc cctgtctccg ggtaaataa	759
	<210> 39	
	<211> 816	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2	
	<400> 39	

atgcaggaag aatgcgaatg ggacccatgg acttgcgaac acatgggatc cggttctgct	60
actgggggtt ccggctccac cgcaagctct gttcaggca gtgcactca tctcgaggg	120
ggagggcgtg gggacaaaac tcacacatgt ccaccttgc cagcacctga actcctgggg	180
ggaccgtcag tttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	240
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	300
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac	360
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	420
aaggagtaca agtgcaggt ctccaacaaa gccctccag cccccatcga gaaaaccatc	480
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccggat	540
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggta aaggcttcta tcccagcgac	600
atcgccgtgg agtgggagag caatggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc	660
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	720
tggcagcagg ggaacgttct ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	780
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataa	816

<210> 40	
5 <211> 867	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2	
10 <400> 40	
atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacccatgga cttgcgaaca catgggatcc	60
ggttctgcta ctgggggttc cggctccacc gcaagctctg gttcaggcag tgcgactcat	120
caggaagaat gcgaatggga cccatggact tgcgaacaca tgctcgaggg tggaggcgg	180
ggggacaaaat ctcacacatg tccacctgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	240
gttttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	300
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgt	360
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	420
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag	480
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	540
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc	600
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgt	660
gagtggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctgac	720
tccgacggct cttcttcctc ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	780
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	840
agcctctccc tgcgtccggg taaataa	867

<210> 41
 <211> 774
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <400> 41

atggacaaaa	ctcacacatg	tccacacatgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	60
gttttcctct	tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctccggac	ccctgaggtc	120
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	180
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	240
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	300
aagtgcagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	360
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	420
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	480
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	540
tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	600
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	660
agcctctccc	tgtctccggg	taaaggtgga	ggtgggtgg	cacagaaatt	caacccgctg	720
gacgagctgg	aagagactct	gtacgaacag	tttactttc	aacagctcga	gtaa	774

10 <210> 42
 <211> 840
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <400> 42

atggacaaaa	ctcacacatg	tccacacatgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	60
gtttcctct	tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgac	ccctgaggtc	120
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	180
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	240
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtagc	300
aagtgcagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	360
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	420
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	480
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	540
tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	600
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	660
agcctctccc	tgtctccggg	taaaggtgga	ggtgggtggt	cacagggatc	cggttctgct	720
actggtggtt	ccggctccac	cgcaagctct	gttcaggca	gtgcgactca	taaattcaac	780
ccgctggacg	aactggaaga	aactctgtac	gaacagttca	ctttccagca	actcgagtaa	840

<210> 43

<211> 858

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<400> 43

atggacaaaa	ctcacacatg	tccacacatgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	60
gtttcctct	tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgac	ccctgaggtc	120
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	180
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	240
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtagc	300
aagtgcagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	360
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	420
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	480
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	540
tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	600
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	660
agcctctccc	tgtctccggg	taaaggtgga	ggtgggtggt	cacagaaatt	caacccgctg	720
gacgaactgg	aagaaaactct	gtacgaacag	ttcactttcc	agcagggtgg	tggtgggtgg	780
ggcgggtggta	agttcaaccc	actggatgag	ctggaagaga	ctctgtatga	acagttcact	840
ttccagcaac	tcgagtaa					858

<210> 44
 <211> 756
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <400> 44

atggacaaaa	ctcacacatg	tccacattgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	60
gttttccctt	tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctccggac	ccctgaggtc	120
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	180
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	240
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtagc	300
aagtgcagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	360
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	420
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	480
gagtggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	540
tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	600
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	660
agcctctccc	tgtctccggg	taaaggtgga	ggtgggtgg	cacagcagga	agaatgcgaa	720
tgggaccat	ggacttgcga	acacatgctc	gagtaa			756

10

<210> 45
 <211> 822
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <400> 45

atggacaaaa ctcacacatg tccacccatgc ccagcacctg aactccctggg gggaccgtca 60
gtttccctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 120
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 360
aaaggcgcgc cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
tccgacggct cttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
ggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtggt cacagggatc cggttctgct 720
actggtggtt ccggctccac cgcaagctct gggtcaggca gtgcgactca tcaggaagaa 780
tgcgaatggg acccatggac ttgcgaacac atgctcgagt aa 822

5 <210> 46
 <211> 864
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <400> 46

atggacaaaa	ctcacacatg	tccacacatgc	ccagcacatg	aactcctggg	gggaccgtca	60
gttttcctct	tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctccggac	ccctgagggtc	120
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtagctg	180
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	240
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtagc	300
aagtgcacgg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	360
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catccggga	tgagctgacc	420
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	480
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	540
tccgacggct	ccttccttcct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	600
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	660

	agcctctccc tgtctccggg taaagggtgga ggtgggtggt cacagcagga agaatgcgaa	720
	tgggacccat ggacttgcga acacatggga tccggttctg ctactggtgg ttccggctcc	780
	accgcaagct ctggttcagg cagcgcgact catcaggaag aatgcgaatg ggacccatgg	840
	acttgcgaac acatgctcga gtaa	864
	<210> 47	
	<211> 906	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2	
	<400> 47	
	atgggtgcac aggaagaatg cgaatggac ccatggactt gcgaacacat gggtggtggt	60
	ggtggtggcg gtggtaaatt caaccgcgtg gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag	120
	ttcactttcc agcagggatc cggttctgct actgggtggtt ccggctccac cgcaagctct	180
	ggttcaggca gtgcgactca tctcgagggt ggaggcggtg gggacaaaac tcacacatgt	240
	ccaccttgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag ttttcctt ccccccaaaa	300
	cccaaggaca ccctcatgtat ctcccgacc cctgaggtca catcgctggt ggtggacgtg	360
	agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacggtt acggcgtgga ggtgcataat	420
	gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc	480
	accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaggt ctccaacaaa	540
	gcccctccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggcagcc ccgagaacca	600
	caggtgtaca ccctgcccccc atcccggtat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc	660
	tgcctggta aaggcttcta tcccagcgtac atcgccgtgg agtggagag caatggcag	720
	ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc	780
	tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	840
	gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	900
10	aaataa	906
	<210> 48	
	<211> 897	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2	
	<400> 48	

atggacaaaa	ctcacacatg	tccacacatgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	60
gttttcctct	tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgac	ccctgaggtc	120
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	180
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	240
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtag	300
aagtgcagg	tctccaaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	360
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	420
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	480
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	540
tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	600
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	660
agcctctccc	tgtctccggg	taaaggtgga	ggtgggtgg	cacagggatc	cggttctgct	720
actgggtggtt	ccggctccac	cgcaagctct	ggttcaggca	gtgcgactca	taaattcaac	780
ccgctggacg	aactggaaga	aactctgtac	gaacagttca	cttccagca	gggtgggtggc	840
ggtggtcagg	aagaatgcga	atgggaccca	tggacttgcg	aacacatgct	cgagtaa	897

5	<210> 49						
	<211> 771						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2						
10	<400> 49						
	atgggtgcac	agttcgacta	ctgcgaaggt	gttgaagacc	cgttcacttt	cggttgcgac	60
	aaccacctcg	agggtggagg	cggtgccccac	aaaactcaca	catgtccacc	ttgcccagca	120
	cctgaactcc	tggggggacc	gtcagtttc	ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	180
	atgatctccc	ggacccctga	gttcacatgc	gtgggtgg	acgtgagcca	cgaagaccct	240
	gaggtcaagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagccg	300
	cgggaggagc	agtacaacag	cacgtaccgt	gtggtcagcg	tcctcaccgt	cctgcaccag	360
	gactggctga	atggcaagga	gtacaagtgc	aaggtctcca	acaaagccct	cccagcccc	420
	atcgagaaaa	ccatctccaa	agccaaaggg	cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	480
	cccccatccc	gggatgagct	gaccaagaac	caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	540
	ttctatcccc	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	600
	aagaccacgc	ctcccgtgct	ggactccgac	ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	660
	gtggacaaga	gcaggtggca	gcagggaaac	gtcttctcat	gctccgtat	gcatgaggct	720
	ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	tccctgtctc	cggtaaataa	a	771

<210> 50
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <400> 50

atgggtgcac	agcagtacgg	ttgcgacggt	tttctgtacg	gttgcatgat	caacctcgag	60
ggtggaggcg	gtggggacaa	aactcacaca	tgtccacctt	gcccagcacc	tgaactcctg	120
gggggaccgt	cagttttcct	cttcccccca	aaacccaagg	acaccctcat	gatctcccg	180
acccctgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	240
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	300
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	360
ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	cagccccat	cgagaaaacc	420
atctccaaag	ccaaaggcga	gccccgagaa	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccg	480
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	540
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	600
cccggtctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	660
aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	720
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaataaa			759

10 <210> 51
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <400> 51

atgggtgcac	agaaacgccc	atgcgaagaa	atgtgggtg	gttgcacta	cgacctcgag	60
ggtggaggcg	gtggggacaa	aactcacaca	tgtccacctt	gcccagcacc	tgaactcctg	120
gggggaccgt	cagtttcct	ttccccca	aaacccaagg	acaccctcat	gatctcccg	180
accctgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	240
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	300
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	360
ggcaaggagt	acaagtgcac	ggtctccaac	aaagccctcc	cagccccat	cgagaaaacc	420
atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccg	480
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	540
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	600
cccggtctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	660
aggtggcagc	aggggaacgt	tttctcatgc	tccgtatgc	atgaggctct	gcacaaccac	720
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaataaa			759

<210> 52

<211> 759

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<400> 52

atgggtgcac	agcaccagat	ctgcaaatgg	gacccgtgga	cctgc当地 aaca	ctggctcgag	60
ggtggaggcg	gtggggacaa	aactcacaca	tgtccacctt	gcccagcacc	tgaactcctg	120
gggggaccgt	cagtttcct	ttccccca	aaacccaagg	acaccctcat	gatctcccg	180
accctgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	240
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	300
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	360
ggcaaggagt	acaagtgcac	ggtctccaac	aaagccctcc	cagccccat	cgagaaaacc	420
atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccg	480
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	540
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	600
cccggtctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	660
aggtggcagc	aggggaacgt	tttctcatgc	tccgtatgc	atgaggctct	gcacaaccac	720
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaataaa			759

10

<210> 53

<211> 759

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<400> 53

atgggtgcac	agaaaacgtcc	atgcgaagaa	atcttcggtg	gttgcaccta	ccagctcgag	60	
ggtgaggcg	gtggggacaa	aactcacaca	tgtccacctt	gcccagcacc	tgaactcctg	120	
gggggaccgt	cagtttcct	tttccccca	aaacccaagg	acaccctcat	gatctcccg	180	
acccctgagg	tcacatgcgt	gttggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	240	
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcgt	aatgccaaga	caaagccg	ggaggagcag	300	
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	360	
ggcaaggagt	acaagtgc	aaagtc	aaagccctcc	cagccccat	cgagaaaacc	420	
atctccaaag	ccaaagg	ccccc	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccg	480	
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	540	
gacatcgccg	tggagtgg	gagcaatgg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgc	600	
cccgtgctgg	actccgacgg	ctc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	660	
aggtggc	aggggaacgt	tttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	720	
5	tacacgcaga	agagc	c	c	gtctccg	gttaataa	759

<210> 54

<211> 25

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 54

cggcgcaact atcggtatca agctg 25

15

<210> 55

<211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 55

catgtaccgt aacactgagt ttgc

26

25 <210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> motivos consenso generados de la genoteca TN8-IX

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7, 12 y)..(14)
 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido natural.
 <400> 56

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Trp Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa
 1 5 10

10 <210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> motivos consenso generados de la genoteca TN8-IX
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7, 12 y)..(14)
 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido natural.
 20 <400> 57

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Phe Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa
 1 5 10

25 <210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Motivos consenso generados de la genoteca TN8-IX
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1, 2, 3, 5 y)..(13)
 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido natural.
 <400> 58

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Xaa Met
 1 5 10

35 <210> 59
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> motivo consenso generado de la genoteca TN12-I
 <220>

<221> misc_feature

<222> (3, 8, 10-14 y)..(18)

<223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido natural.

<400> 59

Trp Ser Xaa Cys Ala Trp Phe Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Arg
1 5 10 15

5 Arg Xaa

<210> 60

<211> 227

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc de IgG1 humana

<400> 60

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

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

. Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225

- <210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Motivos consenso generados de la genoteca TN8-IX
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1-3, 5, 7, 12, 13 y)..(14)
 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido natural.
 <400> 61

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Tyr Trp Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

- 15 <210> 62
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Motivos consenso generados de la genoteca TN8-IX

<220>

<221> misc_feature

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 y)..(14)

5 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido natural.

<400> 62

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Tyr Thr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 63

<211> 14

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivos consenso generados de la genoteca TN8-IX

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 y)..(14)

<223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido natural.

<400> 63

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Phe Trp Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10

20

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Motivos consenso generados de la genoteca TN8-IX

<220>

<221> misc_feature

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 y)..(14)

30 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido natural.

<400> 64

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Phe Thr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10

35 <210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

40 <400> 65

Trp Asp Pro Trp Thr
1 5

5 <210> 66
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 66

Trp Asp Pro Trp Thr Cys
 1 5

10 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 20 <223> Xaa es un residuo aminoácido polar ácido o neutro
 <400> 67

Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr
 1 5

25 <210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es un residuo aminoácido polar ácido o neutro
 <400> 68

Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys
 1 5

35 <210> 69
 <211> 14
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1, 2 y)..(3)
 <223> Xaa son cada uno residuos de aminoácidos independientes.

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido.

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa está ausente o es un residuo de aminoácido.

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o polar neutro.

 <400> 69

xaa	xaa	xaa	cys	xaa	trp	asp	pro	trp	thr	cys	xaa	xaa	xaa
1				5						10			

25 <210> 70
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1 y)..(15)
 <223> Xaa está ausente o es un residuo de aminoácido.

 35 <220> <221> misc_feature
 <222> (2 y)..(16)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3-6, 18, 19 y)..(20)
 <223> Xaa están cada uno de forma independiente ausente o residuos de aminoácidos.

 45 <220>
 <221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa está ausente o es un residuo de aminoácido polar hidrófobo neutro o polar neutro.

<400> 70

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
20

5

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro .

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

20 <223> Xaa es un A, D, o E.

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de aminoácido ácido.

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de aminoácido.

<220> <221> misc_feature

30 <222> (8)..(8)

<223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

<400> 71

Pro Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Tyr
1 5 10

35 <210> 72

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (1, 4 y)..(20)

<223> Xaa está ausente o es un residuo de aminoácido .

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2, 15, 16 y)..(21)
 <223> Xaa está ausente o es un residuo polar neutro, ácido o básico .

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3, 17 y)..(18)
 <223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o polar neutro.

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro .

20 <220>
 <221> mist-feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es un A, D, o E.

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido ácido.

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido.

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19 y)..(22)
 <223> Xaa está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico

<400> 72

1	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Asp	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Tyr	Xaa	Xaa
5															15	
20																

35

<210> 73
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

<210> 75

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de aminoácido ácido;

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro .

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

20 <223> Xaa es E, D, o Q.

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o polar neutro.

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa es un residuo ácido.

<400> 75

30 Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys Xaa
 1 5 10

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 76

Pro Ile Arg Gln Glu Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Trp Glu Val
 20

<210> 77

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 77

Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15

Met Pro Gly Lys
 10 20

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 78

Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Ala Glu Val
 20

20 <210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 79

Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Glu Asn Val
 20

30 <210> 80

<211> 20

5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 80

Ala	Ala	Thr	Gln	Glu	Glu	Cys	Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His
1				5					10					15	

Met	Pro	Arg	Ser
		20	

10 <210> 81
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 81

Leu	Arg	His	Gln	Glu	Gly	Cys	Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His
1				5					10					15	

15 <210> 82
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 82

Val	Pro	Arg	Gln	Lys	Asp	Cys	Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His
1				5					10					15	

Met	Tyr	Val	Gly
		20	

20 <210> 83
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 83

Ser Ile Ser His Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Gln Val Gly
20

<210> 84

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 84

Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Gly Arg Met
20

10 <210> 85

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 85

Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Gly Ser Thr
20

20

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 86

Gly His Ser Gln Glu Glu Cys Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Gly Thr Ser
20

30 <210> 87

- <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 87
- Gln His Trp Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His**
 1 5 10 15
- Met Pro Ser Lys**
 20
- <210> 88
 10 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 15 <400> 88
- Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His**
 1 5 10 15
- Met Pro Val Arg**
 20
- <210> 89
 <211> 20
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 89
- Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His**
 1 5 10 15
- Met Pro Arg Asn**
 20
- <210> 90
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 90

Val Lys Thr Gln Glu His Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Arg Glu Trp
 20

5 <210> 91
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 91

Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

10 Met Leu Pro Met
 20

15 <210> 92
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 92

Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

20 Met Pro Pro Met
 20

25 <210> 93
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 93

Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

30 Met Asp Ile Lys
 20

30 <210> 94

<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
<400> 94

His Gly Gln Asn Met Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Phe Arg Tyr
20

10 <210> 95
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

15 <400> 95

Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Pro Leu Arg
20

20 <210> 96
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
<400> 96

25 Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Glu Ser Gln
20

30 <210> 97
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
<400> 97

Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15

Met Val Ser Ser
 20

<210> 98

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 98

Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Leu Glu Gly Leu
 10 20

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 99

Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15

Met Val Gly Leu
 20

20

<210> 100

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 100

Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Val Arg Ser
 20

30 <210> 101

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 101

Pro	Met	Asn	Gln	Val	Glu	Cys	Asp	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His
1				5				10					15		

Met Pro Arg Ser
20

10 <210> 102
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 15 <400> 102

Phe	Gly	Trp	Ser	His	Gly	Cys	Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His
1				5				10					15		

Met Gly Ser Thr
20

20 <210> 103
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 103

Lys	Ser	Thr	Gln	Asp	Asp	Cys	Asp	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His
1				5				10					15		

Met Val Gly Pro
20

30 <210> 104
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 104

Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Asp Gln Leu
20

<210> 105

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
1 5 10 15

Met Gln Val Asp
20

<400> 105

10

<210> 106

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 106

Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu
1 5 10 15

Leu Gln Gly Trp
20

<210> 107

20 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

25 <400> 107

Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly
20

<210> 108

<211> 20

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 108

Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

Met Gln Gly Gly
 20

5

<210> 109

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 109

Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
 1 5 10 15

Met Gln Ser Gly
 20

15 <210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 110

Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

Met Gln Gly Gly
 20

25 <210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

30 <400> 111

Trp Val Asn Glu Val Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His
 1 5 10 15

Trp Asp Thr Pro
 20

<210> 112

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 112

Val Val Gln Val Gly Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His
 1 5 10 15

Met Arg Leu Gln
 10 20

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 113

Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

Leu Val Glu Val
 20

20

<210> 114

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 114

Gln Gly Met Lys Met Phe Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

Ile Val Tyr Arg
 20

30 <210> 115

<211> 20

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

5 <400> 115

Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15
Met Gln Gly Gly
20

<210> 116

10 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

15 <400> 116

Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His
1 5 10 15

Leu Thr Tyr Thr
20

<210> 117

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 117

Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr
1 5 10 15

Val Trp Pro Ser
20

25

<210> 118

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Secu

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 118

Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
 1 5 10 15

Met Val Gln Gly
 20

<210> 119

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 119

Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His
 1 5 10 15

Phe Ile Phe His Tyr Thr
 20

10 <210> 120

<211> 22

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 120

Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Ser
 20

20

<210> 121

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 121

Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Gln
 20

30 <210> 122

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 122

1	Val	Lys	Phe	Lys	Pro	Leu	Asp	Ala	Leu	Glu	Gln	Thr	Leu	Tyr	Glu	His
					5					10					15	

Trp Met Phe Gln Gln Ala
 20

10 <210> 123
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 15 <400> 123

1	Val	Lys	Tyr	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr	Glu	Gln
					5					10				15		

Gln Thr Phe Gln Glu Arg
 20

20 <210> 124
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 124

1	Thr	Asn	Phe	Met	Pro	Met	Asp	Asp	Leu	Glu	Gln	Arg	Leu	Tyr	Glu	Gln
					5					10				15		

Phe Ile Leu Gln Gln Gly
 20

25 <210> 125
 <211> 22
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 125

Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Ala
 20

<210> 126

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 126

Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Met Leu Gln Gln Ala
 10 20

<210> 127

<211> 22

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 127

Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr Leu Tyr Lys Gln
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Gln His Ser
 20

20

<210> 128

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 128

Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Val
 30 20

30 <210> 129

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 129

Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr Leu Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

Trp Met Phe His Gln Arg
 20

10 <210> 130
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 15 <400> 130

Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Met Leu Gln His Gln
 20

20 <210> 131
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 25 <400> 131

Gln Lys Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr Leu Tyr Asp Gln
 1 5 10 15

Phe Met Leu Gln Gln Gly
 20

30 <210> 132
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 132

Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Lys Gln
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
20

<210> 133

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 133

Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp Leu Tyr His Gln
1 5 10 15

Phe Thr Leu His His Gln
20

10

<210> 134

<211> 22

<212> PRT

15 <213> Secu

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 134

Gln Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Phe Met Phe Gln Gln Ser
20

20

<210> 135

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 135

Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Trp Ile Arg Arg Tyr His
20

30 <210> 136

5 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 136

Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Ile Leu Leu His Gly
 20

10 <210> 137
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 15 <400> 137

His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Tyr Gln
 1 5 10 15

Trp Leu Tyr Asp Gln Leu
 20

20 <210> 138
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 138

Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Glu
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Gln His Ala
 20

25 <210> 139
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 139

Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His
 1 5 10 15

Trp Ile Leu Gln His Ser
 20

<210> 140

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 140

Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
 20

10 <210> 141

<211> 22

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 141

Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
 20

20

<210> 142

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 142

Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
 20

30 <210> 143

5 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 143

Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr
 1 5 10 15

Asp Val Gln Ala
 20

10 <210> 144
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 15 <400> 144

Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp
 1 5 10 15

Arg Arg Cys Ile
 20

20 <210> 145
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 145

Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr
 1 5 10 15

Gln Arg Ile Val
 20

25 <210> 146
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 146

Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln
 1 5 10 15

Asn Leu Ala Leu
 20

<210> 147

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 147

Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln
 1 5 10 15

Leu Cys Pro Arg
 10 20

<210> 148

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 148

Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 1 5 10 15

Asp Trp Tyr Gly
 20

20

<210> 149

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 149

Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Gln Thr
 20

<210> 150

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 150

Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys
1 5 10 15

Asp Asn Gln Ser
20

10 <210> 151

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 151

Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
1 5 10 15

Glu Lys Gln Arg
20

20 <210> 152

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

25 <400> 152

Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
1 5 10 15

Glu Met Gln Lys
20

30 <210> 153

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

<400> 153

Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Asn Leu Asp
 20

5 <210> 154
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 10 <400> 154

His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Tyr Gln Gly
 20

15 <210> 155
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 155

Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

20 Asp Lys Gln Met
 20

25 <210> 156
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 156

Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Asn Gln Arg
 20

30

<210> 157

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2
 <400> 157

Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Arg
 20

10 <210> 158
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2, 4, 14)..(19)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o polar neutro.

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3, 6)..(17)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido ácido.

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro .

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es E, D, o Q.

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

<400> 158

xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys
 1 5 10 15

xaa Xaa Xaa Xaa
 20

5 <210> 159
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 159

10 ccgatccgtc aggaagaatg cgactggac ccgtggacct gcgaacacat gtggaaagt 60

15 <210> 160
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 160

20 accaacatcc aggaagaatg cgaatggac ccgtggacct gcgaccacat gccggtaaa 60

25 <210> 161
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 161

30 tggtagcaac aggacgcttg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat ggctgaagt 60

35 <210> 162
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 162

aaccgtctgc aggaagttg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat ggaaaacgtt 60

<210> 163 <211> 60 <212> ADN<213> Secuencia artificial
<220> <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
<400> 163 gctgctaccc aggaagaatg cgaatggac ccgtggacct gccaacacat gccgcgtcc 60

5

<210> 164 <211> 60 <212> ADN<213> Secuencia artificial
<220> <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
<400> 164 ctgcgtcacc aggaagggtt cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gttcgactgg 60

10

<210> 165
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
<400> 165

gttccgcgtc aqaaaqactq cgaatqqqac ccgtqqacct qcqaacacat qtacgttqgt 60

20 <210> 166

<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 166

<210> 167
<211> 60
<212> ADN

<215> Secuencia articular

25 100-167

acttggccggc agggccaaatc cggaaatggat ccgtggaaat cggaaacacat gggttctact 60

<210> 168

<210> 100

40 <212> ADN

<212> ADN

<220>
<223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 168

ggtcactccc aggaagaatg cggttgggac ccgtggacct gcgaacacat gggtacgtcc 60

5 <210> 169
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

10 <400> 169

cagcactggc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaccacat gccgtccaaa 60

15 <210> 170
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 170

20 aacgttcgtc aggaaaaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gccggtcgt 60

25 <210> 171
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 171

aaatccggtc aggtgaatg caactgggac ccgtggacct gcgaacacat gcccgtaac 60

30

<210> 172
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 172

gttaaaaccc aggaacactg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gcgtaatgg 60

40 <210> 173
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 173
 gcttggggtc aggaagggtg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gctgccatg 60

5

<210> 174
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 174
 ccggtaacc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcccgtg 60

15 <210> 175
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

20 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 175
 cgtgctccgc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat ggacatcaa 60

25 <210> 176
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

30 <400> 176
 cacggtcaga acatggaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gttccgttac 60

<210> 177
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 177

40 ccgcgtctgc aggaagaatg cgttgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgctgcgt 60
 <210> 178
 <211> 60

5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 5 <400> 178
 cgtaccaccc agaaaaatg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat ggaatcccag 60

10 <210> 179
 <211> 60
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 179
 15 cagacctccc aggaagactg cgttggac ccgtggacct gcgaccacat ggttccccc 60

20 <210> 180
 <211> 60
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 180
 caggttatcg gtcgtccgtg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat ggaaggctcg 60

25 <210> 181
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 181
 tgggctcagc aggaagaatg cgctggac ccgtggacct gcgaccacat ggttggctcg 60

35 <210> 182
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial 60
 <220>
 40 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 182
 ctgccgggtc aggaagactg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat ggttcggtcc 60

<210> 183
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 183
 ccgatgaacc aggttaatg cgactggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgttcc 60

10 <210> 184
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 184
 ttccgggttgc ctcacgggtg cgaatggat ccgtggactt gcgaacacat gggttctacc 60

20 <210> 185
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 25 <400> 185
 aaatccaccc aggacgactg cgactggac ccgtggacct gcgaacacat gggtggtccg 60

30 <210> 186
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 186

35 ggtccgcgtt tctccacactg ccagtggac ccgtggacct gcgaacacat ggaccagctg 60

40 <210> 187
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 187

tccaccatcg gtgacatgtg cgaatggac ccgtggacct ggcgtcacat gcaggttgac 60

 <210> 188
 <211> 60
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 188

 10 gttctgggtg gtcagggttg cgaatggac ccgtggacct gccgtctgt gcagggttgg 60

 <210> 189
 <211> 60
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 189

 gttctgggtg gtcagggttg ccagtggac ccgtggacct gctcccacat ggaagacggt 60

 20
 <210> 190
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 190

 accaccatcg gttccatgtg cgaatggac ccgtggacct ggcgtcacat gcagggtggt 60

 30 <210> 191
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 191

 accaaaggta aatccgttg ccagtggac ccgtggacct gctcccacat gcagtccggt 60

 40 <210> 192

 <211> 60
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 192

5 accaccatcg gttccatgtg ccagtggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggttgt 60

<210> 193
 <211> 60
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 193

tgggttaacg aagtgttgtg cgaatggac ccgtggacct gcaaccactg ggacaccccg 60

15 <210> 194
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 194

gttgttcagg ttggtatgtg ccagtggac ccgtggacct gcaaacacat gcgtctgcag 60

25 <210> 195
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 195

gctgtggtt cccagacactg cgaatggac ccgtggacct gcgctcacat ggtgaagt 60

35 <210> 196
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

40 <400> 196

cagggtatga aaatgtctcg cgaatggac ccgtggacct gcgctcacat cgttaccgt 60

<210> 197
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 197
 accaccatcg gttccatgtg ccagtggac ccgtggacct gcgaacacat gcagggtgt 60

10 <210> 198
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 198
 acctcccagc gtgtgggtg cgaatggac ccgtggacct gccagcacct gacctacacc 60

20 <210> 199
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 25 <400> 199
 cagtggtcct ggccgcccgtg cgaatggac ccgtggacct gccagaccgt ttggccgtcc 60

30 <210> 200
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 200

35 <210> 201
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 201

	caggaagaat gcgaatggga cccatggact tgcgaacaca tg	42
	<210> 202	
	<211> 66	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2	
10	<400> 202	
	cagaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactt catcttccac	60
	tacacc	66
	<210> 203	
	<211> 66	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 203	
	ctgaacttca ccccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60
	cagtcc	66
20		
	<210> 204	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 204	
	accaaattca acccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60
	caccag	66
30	<210> 205	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 205	
	gttaaattca aaccgctgga cgctctggaa cagaccctgt acgaacactg gatgttccag	60
	caggct	66

5 <210> 206
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 206

gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagca gacccatcag	60
gaacgt	66

10 <210> 207
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 207

accaacttca tgccgatgga cgacctggaa cagcgtctgt acgaacagtt catcctgcag	60
cagggt	66

20 <210> 208
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 208

tccaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60
cacgct	66

25 <210> 209
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 209

cagaaattcc agccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag	60
caggct	66

<210> 210
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ARN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 210
cagaacttca aaccgatgga cgaattggaa gacaccctgt acaaacagtt cctgttccag 60
cactcc 66

10 <210> 211
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 211
tacaaattca ccccgctgga cgacctggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
cacgtt 66

20 <210> 212
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

25 <400> 212
aggaatacga accgctggac gaactggacg aaaccctgta caaccagtgg atgttccacc 60
agcgt 65

30 <210> 213
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 213
tccaaacttca tgccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag 60
caccag 66

<210> 214
 <211> 66

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

5 <400> 214

cagaaaatacc **agccgctgga cgaactggac aaaaccctgt acgatcagtt catgctgcag** 60

<210> 215
 <211> 66

10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 215

cagaaaattcc **agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt acaaacagtg gaccctgcag** 60

15 **cagcgt** 66

<210> 216
 <211> 66
 <212> ADN

20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 216

gttaaataca **aaccgctgga cgaactggac gaatggctgt accaccagtt caccctgcac** 60

caccag 66

25

<210> 217
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 217

cagaaaattca **tgccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagtt catgttccag** 60

cagtcccc 67

35 <210> 218
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

	<223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 218	
	cagaccttcc agccgctgga cgacctggaa gaataacttgt acgaacagtg gatccgtcgt	60
	taccac	66
5	<210> 219	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 219	
	gaagactaca tgccgctgga cgctctggac gctcagctgt acgaacagtt catcctgctg	60
	cacggt	66
15	<210> 220	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 220	
	cacaccttcc agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt actaccagtg gctgtacgac	60
	cagctg	66
25	<210> 221	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2	
30	<400> 221	
	tacaaattca acccgatgga cgaactggaa cagaccctgt acgaagaatt cctgttccag	60
	cacgct	66
35	<210> 222	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2	

	<400> 222		
	accactaca aaccgttggc cgaactggac gttttttttt acgtttttttt gttttttttt	60	
	caactcc		66
	<210> 223		
5	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2		
10	<400> 223		
	cagaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60	
	cagcgt		66
	<210> 224		
	<211> 66		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2		
	<400> 224		
	accaaattcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60	
	cagcgt		66
20			
	<210> 225		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2		
	<400> 225		
	accaacttcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60	
	cagcgt		66
30	<210> 226		
	<211> 60		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2		
	<400> 226		
	aaattcaacc cgctggacga gctggaagag actctgtacg aacagttac ttttcaacag	60	

5 <210> 227
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 227
 gctggggta tgcgtccgta cgacggatag ctgggtggc cgaactacga cgttcaggct 60

10 <210> 228
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 228
 cagacttggg acgatccgtg catgcacatt ctgggtccgg ttacttggcg tcgttgcatc 60

20 <210> 229
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 229
 gctccgggtc agcgtccgta cgacggatag ctgggtggc cgacccatcca gcgtatcggt 60

30 <210> 230
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 35 <400> 230
 tccggtcagc tgcgtccgtg cgaagaaaatc ttccgggtgcgt gtacccagaa cctggctctg 60

40 <210> 231
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 231

ttcggtgaca aacgtccgct ggaatgcata ttcggtggt cgatccagct gtgcccgcgt 60

5 <210> 232
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

10 <400> 232

ggtcaggacc tgcgtccgtg cgaagacatg ttcggttgcg gtaccaaaga ctggtaacgtt 60

15 <210> 233
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 233

20 <400> 233

ggttcgaat actgcgacgg tatggaagac ccgttcacct tcggttgcga caaacagacc 60

25 <210> 234
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 234

30 <400> 234

aaactggaat actgcgacgg tatggaagac ccgttcacctt agggttgcga caaccagtc 60

35 <210> 235
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 235

40 <400> 235

ctgcaggaat ggtgcgaagg tggtaagac ccgttcacct tcggttgcga aaaacagcgt 60

<210> 236
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 236
 gtcaggact actgcgaagg tatggaagac ccgttcacct tcggttgcga aatgcagaaa 60

5

<210> 237
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 237
 ctgctggact actgcgaagg tggtcaggac ccgttcacct tcggttgcga aaacctggac 60

15 <210> 238
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 238
 caccaggaat actgcgaagg tatggaagac ccgttcacct tcggttgcga ataccagggt 60

20

<210> 239
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 239
 atgctggact actgcgaagg tatggacgac ccgttcacct tcggttgcga caaacagatg 60

25

<210> 240
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNque codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2
 <400> 240
 ctgcaggact actgcgaagg tggtgaagac ccgttcacct tcggttgcga aaaccagcgt 60

30

<210> 241
 <211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 241

ctgcaggact actgcgaagg tggtaagac ccgttacct tcggttgcga aaaacagcgt 60

<210> 242

10 <211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

15 <400> 242

ttcgactact gcgaagggtgt tgaagaccgg ttcaacttcg gctgtgataa ccac 54

<210> 243

<211> 250

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica un péptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 243

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp
 225 230 235 240

Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn
 245 250

5 <210> 244
 <211> 29
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 244

5 caaacgaatg gatcctcatt aaagccaga 29

<210> 245
 <211> 42
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 245

ggtggtgcgcc cgccactcga gactgttgaa agttgttag ca 42

15 <210> 246
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 246

caaacgaatg gatcctcatt aaagccaga 29

25 <210> 247
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> oligonucleótido
 <400> 247

aacacaaaaaag tgcacaggggt ggagggtggtg gtgcggccgc act 43

35 <210> 248
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido

40 <400> 248

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Asn Asn
 20 25 30

Lys Asn Asn Lys Ser Ala Arg Thr Gly Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly
 35 40 45

Thr Gly Gly Ala Ser Cys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn
 50 55 60

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
 85 90

<210> 249
 <211> 91
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 249

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Ala Ala Lys Cys Gly Lys Cys Cys
 20 25 30

Lys Asn Asn Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Ala Thr Lys Thr Thr Lys
 35 40 45

Gly Gly Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Ala Cys Lys Thr Ala Lys Cys
 50 55 60

Ala Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
 85 90

10 <210> 250
 <211> 95
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 250

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr
 20 25 30

Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys
 35 40 45

Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr
 50 55 60

Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn
 65 70 75 80

Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85 90 95

5 <210> 251

<211> 91

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

10 <400> 251

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Lys Gly Ala Lys Gly Ala
 20 25 30

Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Thr Gly Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys
 35 40 45

Thr Gly Lys Ala Cys Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Ala
 50 55 60

Thr Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
 85 90

15 <210> 252

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 252

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Thr Thr Lys Gly Ala Lys Thr Ala Lys Asn Asn Lys Gly Ala
 20 25 30

Lys Gly Gly Lys Gly Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys
 35 40 45

Thr Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Gly
 50 55 60

Ala Lys Ala Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85

5 <210> 253

<211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> oligonucleótido

<400> 253

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr
 20 25 30

Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys
 35 40 45

Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr
 50 55 60

Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn
 65 70 75 80

Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85 90 95

15 <210> 254

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 254

cacagtgcac aggg 15

5 <210> 255

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> oligonucleótido

<400> 255

tgatctcgag agaatg 16

15 <210> 256

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

20 <400> 256

gttagctcac tcattaggcac 21

25 <210> 257

<211> 21

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial <220>

<223> oligonucleótido

<400> 257

gtaccgtaac actgagttcg 21

30

<210> 258

<211> 18

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 258

ttacactta tgcttccg 18

40

<210> 259
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)

10 <223> Xaa = Fc
 <400> 259

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	Arg	Gln	Glu	Glu	Cys
1		5				10			15					

Asp	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His	Met	Trp	Glu	Val	Leu	Glu
						20		25				30		

15 <210> 260
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc
 <400> 260

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Asn	Ile	Gln	Glu	Glu	Cys
1		5				10		15						

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Asp	His	Met	Pro	Gly	Lys	Leu	Glu
						20		25				30		

25 <210> 261
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature

30 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc
 <400> 261

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Ala Glu Val Leu Glu
 20 25 30

<210> 262

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 262

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Asn Val Leu Glu
 20 25 30

15

<210> 263

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 263

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 264

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

5 <400> 264

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Leu	Arg	His	Gln	Glu	Gly	Cys
1	5	10	15											

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His	Met	Phe	Asp	Trp	Leu	Glu
20	25	30												

<210> 265
 <211> 31

10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

15 <400> 265

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Val	Pro	Arg	Gln	Lys	Asp	Cys
1	5	10	15											

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His	Met	Tyr	Val	Gly	Leu	Glu
20	25	30												

20 <210> 266
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)

30 <223> Xaa = Fc

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Glu	Glu	Cys
1	5	10	15											

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His	Met	Gln	Val	Gly	Leu	Glu
20	25	30												

<210> 267

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 10 <400> 267

 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15

 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Arg Met Leu Glu
 20 25 30

<210> 268
 <211> 31
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 268

 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
 1 5 10 15

 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu
 20 25 30

25 <210> 269
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 35 <223> Xaa = Fc
 <400> 269

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly His Ser Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Thr Ser Leu Glu
 20 25 30

<210> 270

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 270

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln His Trp Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Ser Lys Leu Glu
 20 25 30

--

15 <210> 271

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 271

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Val Arg Leu Glu
 20 25 30

<210> 272

<211> 31

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

5 <400> 272

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Lys	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Cys
1	5	10	15											

 Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Asn Leu Glu

20	25	30	
----	----	----	--

<210> 273
 <211> 31

10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

15 <400> 273

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Val	Lys	Thr	Gln	Glu	His	Cys
1	5	10	15											

 Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Arg Glu Trp Leu Glu

20	25	30	
----	----	----	--

<210> 274
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Ala	Trp	Gly	Gln	Glu	Gly	Cys
1	5	10	15											

 Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Pro Met Leu Glu

20	25	30	
----	----	----	--

<210> 275
 <211> 31

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 275

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys
 1 5 10 15

10 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Pro Met Leu Glu
 20 25 30

<210> 276
 <211> 31
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 276

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Asp Ile Lys Leu Glu
 20 25 30

25 <210> 277
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 35 <223> Xaa = Fc
 <400> 277

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gly Gln Asn Met Glu Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Arg Tyr Leu Glu
 20 25 30

<210> 278

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 278

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Leu Arg Leu Glu
 20 25 30

15

<210> 279

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 279

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Ser Gln Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 280

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

5 <400> 280

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys
 1 5 10 15

Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Ser Ser Leu Glu
 20 25 30

<210> 281
 <211> 31
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 281

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Leu Glu Gly Leu Leu Glu
 20 25 30

20

<210> 282
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 30 <223> Xaa = Fc

<400> 282

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Gly Leu Leu Glu
 20 25 30

<210> 283

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 10 <400> 283

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Leu	Pro	Gly	Gln	Glu	Asp	Cys
1				5				10					15	

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His	Met	Val	Arg	Ser	Leu	Glu
							20		25				30	

<210> 284

15 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 284

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Pro	Met	Asn	Gln	Val	Glu	Cys
1				5				10					15	

Asp	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Glu	His	Met	Pro	Arg	Ser	Leu	Glu
							20		25				30	

25 <210> 285
 <211> 31
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 285

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu
 20 25 30

<210> 286

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 286

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys
 1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Gly Pro Leu Glu
 20 25 30

15

<210> 287

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 287

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Asp Gln Leu Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 288

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

5 <400> 288

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Thr	Ile	Gly	Asp	Met	Cys
1				5					10					15	

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Ala	His	Met	Gln	Val	Asp	Leu	Glu
				20				25					30	

<210> 289
 <211> 31
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 289

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Val	Leu	Gly	Gly	Gln	Gly	Cys
1				5					10				15		

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Arg	Leu	Leu	Gln	Gly	Trp	Leu	Glu
				20				25				30		

20

<210> 290
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)

30 <223> Xaa = Fc

<400> 290

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Val	Leu	Gly	Gly	Gln	Gly	Cys
1				5					10				15		

Gln	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Ser	His	Leu	Glu	Asp	Gly	Leu	Glu
				20				25				30		

<210> 291

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 10 <400> 291

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Thr	Ile	Gly	Ser	Met	Cys
1		5				10					15			

Glu	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Ala	His	Met	Gln	Gly	Gly	Leu	Glu
				20				25					30	

<210> 292
 <211> 31
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 292

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Lys	Gly	Lys	Ser	Val	Cys
1		5				10			15					

Gln	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Cys	Ser	His	Met	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu
				20				25					30	

25 <210> 293
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 35 <223> Xaa = Fc
 <400> 293

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 294

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 294

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Val Asn Glu Val Val Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His Trp Asp Thr Pro Leu Glu
 20 25 30

15

<210> 295

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 295

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Val Gln Val Gly Met Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Met Arg Leu Gln Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 296

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

5 <400> 296

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Leu Val Glu Val Leu Glu

20

25

30

10 <210> 297
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 297

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Gly Met Lys Met Phe Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Ile Val Tyr Arg Leu Glu
 20 25 30

20 <210> 298
 <211> 31
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 298

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Gly Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 299
 <211> 31
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 299

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His Leu Thr Tyr Thr Leu Glu
 20 25 30

15 <210> 300
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 25 <223> Xaa = Fc
 <400> 300

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr Val Trp Pro Ser Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 301
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 301

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Val Gln Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 302

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 302

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Gly Leu His Gln Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys Val Leu Trp Pro Ser Leu Glu
 20 25 30

15

<210> 303

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 303

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Trp Arg Ser Gln Val Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn Leu Gly Gly Asp Trp Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 304

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

5 <400> 304

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Phe Phe Tyr Gly Ala Leu Glu
 20 25 30

<210> 305

<211> 31

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

15 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 305

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Thr Phe Ala Arg Gln Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala Leu Gly Gly Asn Trp Leu Glu
 20 25 30

20

<210> 306

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature
 <222> (2)..(2)

30 <223> Xaa = Fc

<400> 306

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Pro Leu Pro Leu Met Leu Glu
 20 25 30

<210> 307

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 10 <400> 307

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Arg	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Ser
1		5				10		15						

Gln	Trp	Asp	Pro	Trp	Thr	Trp	His	Leu	Gln	Gly	Tyr	Cys	Leu	Glu
20						25		30						

<210> 308
 <211> 31
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 308

Met	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Leu	Trp	Gln	Leu	Ala	Val	Cys
1		5				10		15						

Gln	Trp	Asp	Pro	Gln	Thr	Cys	Asp	His	Met	Gly	Ala	Leu	Leu	Glu
20						25		30						

25 <210> 309
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 35 <223> Xaa = Fc
 <400> 309

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Leu Val Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Asp Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 310

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 310

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Gly Gly Ala Gly Arg Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

15

<210> 311

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 311

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Phe Leu Pro Asn Glu Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser Asn Leu Pro Glu Ala Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 312

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

5 <400> 312

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 313
 <211> 31

10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 313

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Pro Gln Thr Glu Gly Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu His Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

20 <210> 314
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 314

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Asp Thr Arg Gln Gly Cys
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Tyr Gly Met Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 315
 <211> 31

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc
<400> 315

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
1 5 10 15

10 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
10 20 25 30

<210> 316
<211> 31
<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

<400> 316

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Glu Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
20 25 30

25 <210> 317
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

35 <400> 317

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 318

<211> 34

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 318

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

15

<210> 319

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 319

Met Gly Ala Gln Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr

1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Trp Ile Leu Gln His Ser Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

30 <210> 320

<211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa = Fc
 10 <400> 320

Met Gly Ala Gln Gln Lys Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Asp Gln Phe Met Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 321
 <211> 34
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 321

Met Gly Ala Gln Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

25

<210> 322
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)

35 <223> Xaa = Fc

<400> 322

Met	Gly	Ala	Gln	Gln	Lys	Phe	Gln	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Thr
1															15

Leu	Tyr	Glu	Gln	Phe	Met	Leu	Gln	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	
															30

Gly Xaa

<210> 323

5 <211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 323

Met	Gly	Ala	Gln	Gln	Glu	Tyr	Glu	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Asp	Glu	Thr
1															15

Leu	Tyr	Asn	Gln	Trp	Met	Phe	His	Gln	Arg	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	
															30

Gly Xaa

15 <210> 324

<211> 34

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 324

Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Gln Thr Phe Gln Glu Arg Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 325

<211> 34

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 325

Met Gly Ala Gln Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

15

<210> 326

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 326

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 329
<211> 34

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 329

10

Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Val Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 330
 <211> 34
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 330

Met Gly Ala Gln Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Phe Ile Phe His Tyr Thr Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

25 <210> 331
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 331

Met Gly Ala Gln Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Trp Met Phe Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

5 Gly Xaa

<210> 332

<211> 34

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 332

Met Gly Ala Gln Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Leu His Gly Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

20 <210> 333

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

30 <400> 333

Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Phe Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 334

<211> 34

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 334

Met Gly Ala Gln Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln His Gln Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

15

<210> 335

<211> 34

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 335

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Lys Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 336

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 336

Met	Gly	Ala	Gln	Gln	Lys	Phe	Met	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Asp	Glu	Ile
1					5				10					15	

Leu	Tyr	Glu	Gln	Phe	Met	Phe	Gln	Gln	Ser	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly
				20				25					30		

Gly Xaa

15

<210> 337

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 337

Met	Gly	Ala	Gln	Thr	Lys	Phe	Asn	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Thr
1				5					10					15	

Leu	Tyr	Glu	Gln	Trp	Thr	Leu	Gln	His	Gln	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly
				20				25					30		

Gly Xaa

30 <210> 338

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 338

Met Gly Ala Gln His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Tyr Gln Trp Leu Tyr Asp Gln Leu Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

5 Gly Xaa

<210> 339

<211> 34

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (34) .. (34)

<223> Xaa = Fc

<400> 339

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

20 <210> 340

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

30 <400> 340

Met Gly Ala Gln Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Ile Arg Arg Tyr His Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 341

<211> 34

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 341

Met Gly Ala Gln Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr

1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

15 <210> 342

<211> 31

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 342

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys
 1 5 10 15

Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln Asn Leu Ala Leu Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 343

<211> 31

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc
<400> 343

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr
1 5 10 15

Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr Asp Val Gln Ala Leu Glu
10 20 25 30

<210> 344
<211> 31

15 <213> Secuencia artificial
<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

<400> 344

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys
1 5 10 15

Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys Asp Trp Tyr Gly Leu Glu
20 25 30

25 <210> 345
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<220> peptide_pos
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

35 <400> 345

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr
 1 5 10 15

Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr Gln Arg Ile Val Leu Glu
 20 25 30

<210> 346

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 346

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys
 1 5 10 15

Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp Arg Arg Cys Ile Leu Glu
 20 25 30

15

<210> 347

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 347

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu
 1 5 10 15

Glu Cys Met Phe Gly Pro Ile Gln Leu Cys Pro Arg Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 348

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 348

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile
1 5 10 15

Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln Leu Glu
5 20 25

<210> 349

<211> 31

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 349

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly
1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu
20 25 30

20 <210> 350

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

30 <400> 350

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Met Leu Glu
20 25 30

<210> 351

<211> 31

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 351

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Tyr Gln Gly Leu Glu
20 25 30

10

<210> 352

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

20 <223> Xaa = Fc

<400> 352

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Gln Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 353

25 <211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 353

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly
 1 5 10 15

Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Leu Asp Leu Glu
 20 25 30

<210> 354

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 354

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly
 1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Thr Leu Glu
 20 25 30

15

<210> 355

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 355

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly
 1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Met Gln Lys Leu Glu
 20 25 30

30 <210> 356

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

5 <400> 356

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu
 20 25 30

<210> 357
 <211> 31
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

15 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 357

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly
 1 5 10 15
 Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys Asp Asn Gln Ser Leu Glu
 20 25 30

20

<210> 358
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a la Ang-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)

30 <223> Xaa = Fc

<400> 358

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val
 1 5 10 15
 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu
 20 25

35 <210> 359
 <211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a la Ang-2

5 <400> 359

Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp
1 5 10 15

Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu
20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un pepticuerpo capaz de unirse a la Ang-2, en el que el pepticuerpo comprende la secuencia expuesta en la SEC ID Nº 25, en combinación con un agente antiinflamatorio, para uso en un procedimiento para tratar una enfermedad inflamatoria.
- 5 2. El pepticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente antiinflamatorio comprende al menos uno de un DMARD (fármaco antirreumático modificador de enfermedad); SAARD (fármaco antirreumático de acción lenta) y AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo).
- 10 3. El pepticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente antiinflamatorio comprende al menos uno de un inhibidor de TNF, un inhibidor de IL-1, un inhibidor de TACE, un inhibidor de COX-2 y un inhibidor de P-38.
4. El pepticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el inhibidor de TNF comprende al menos uno de etanercept, adalimumab, pegasunercept (PEG sTNF-R1), onercept e infliximab.
5. El pepticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho inhibidor de IL-1 es al menos uno de anakinra, IL-1 TRAP, anticuerpo de IL-1 y receptor de IL-1 soluble.

15

FIG. 1

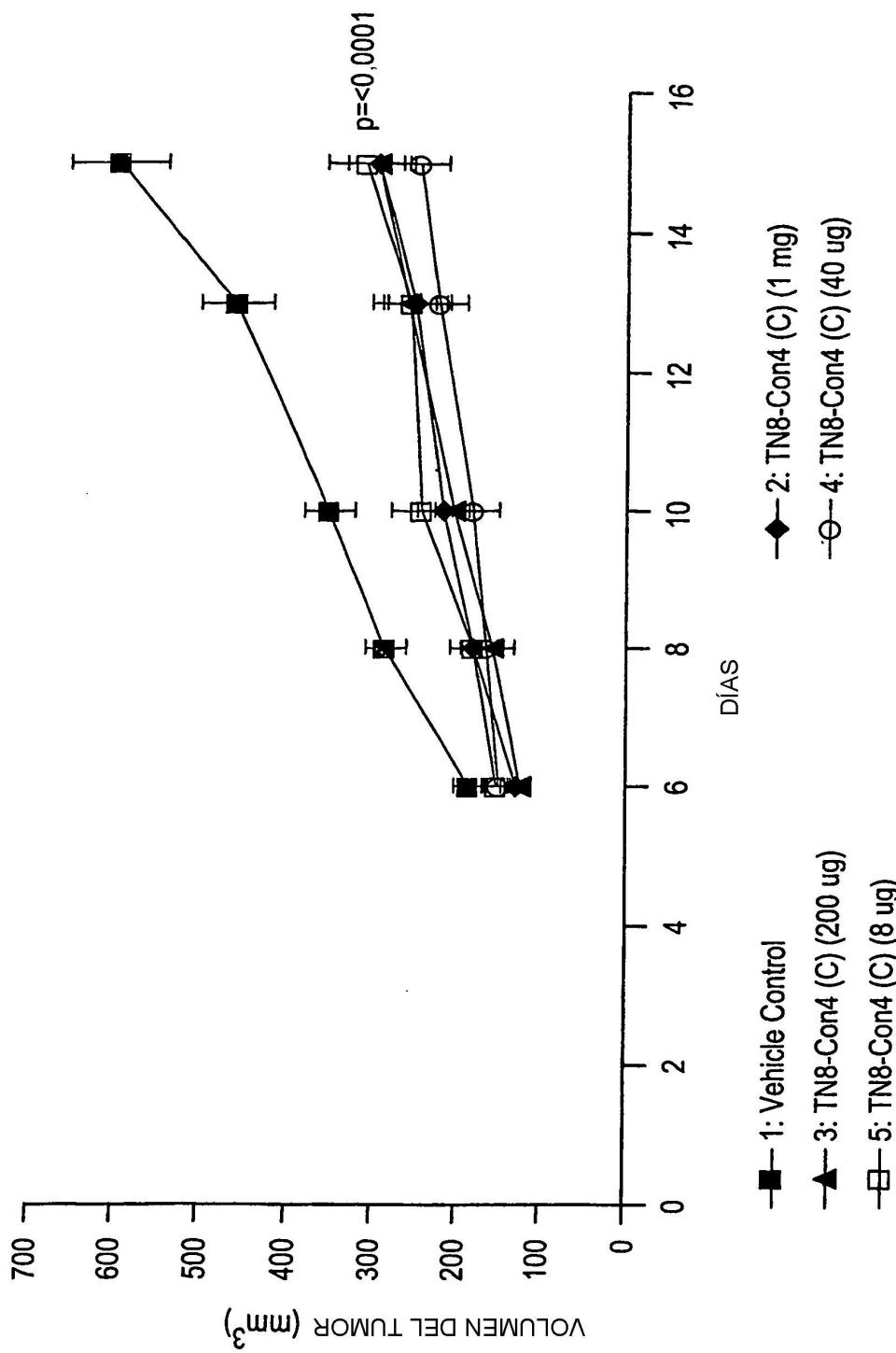


FIG. 2

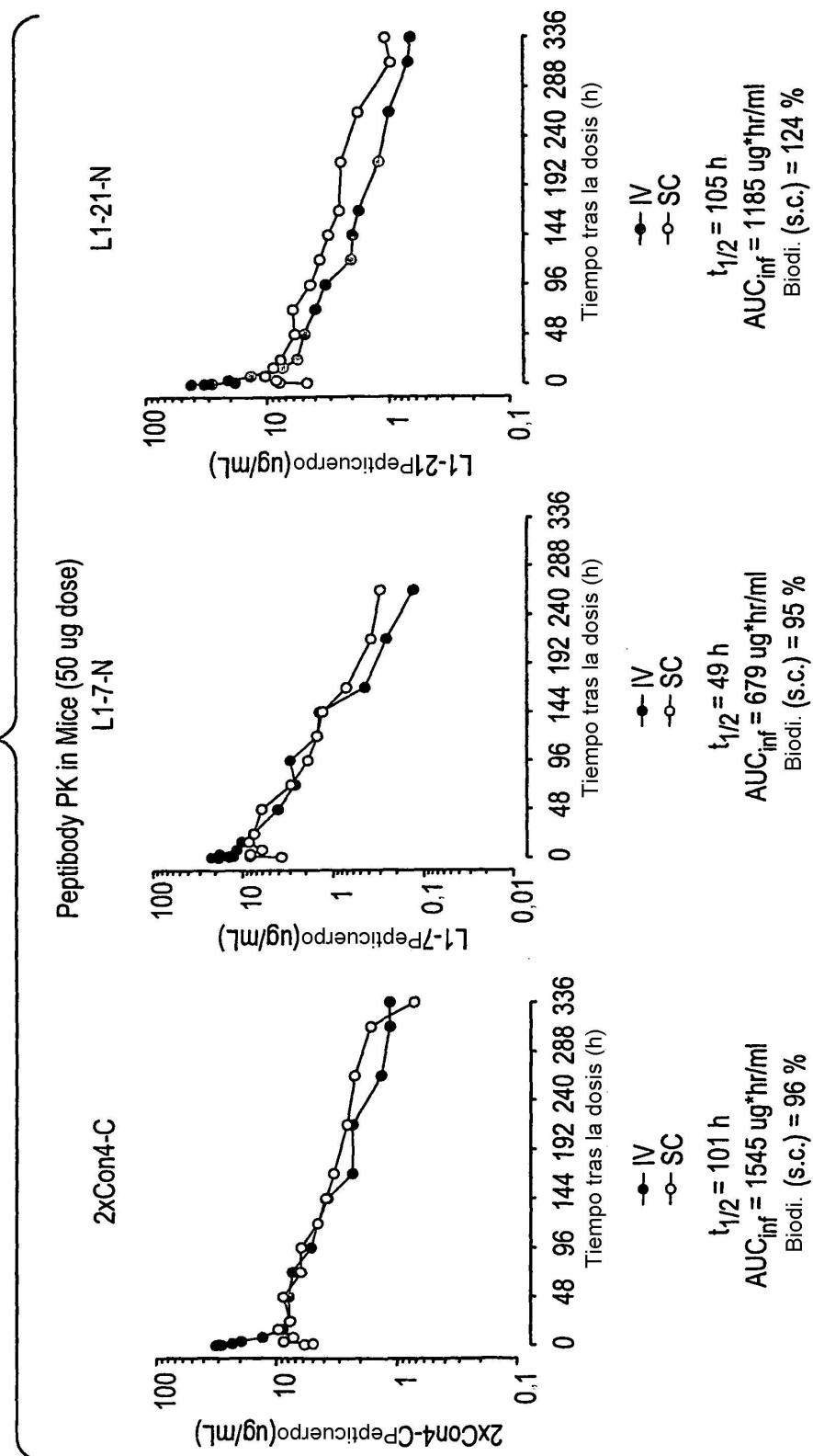


FIG. 3

Los pepticuerpos anti-Ana2 inhiben el crecimiento del xenoinjerto tumoral A431

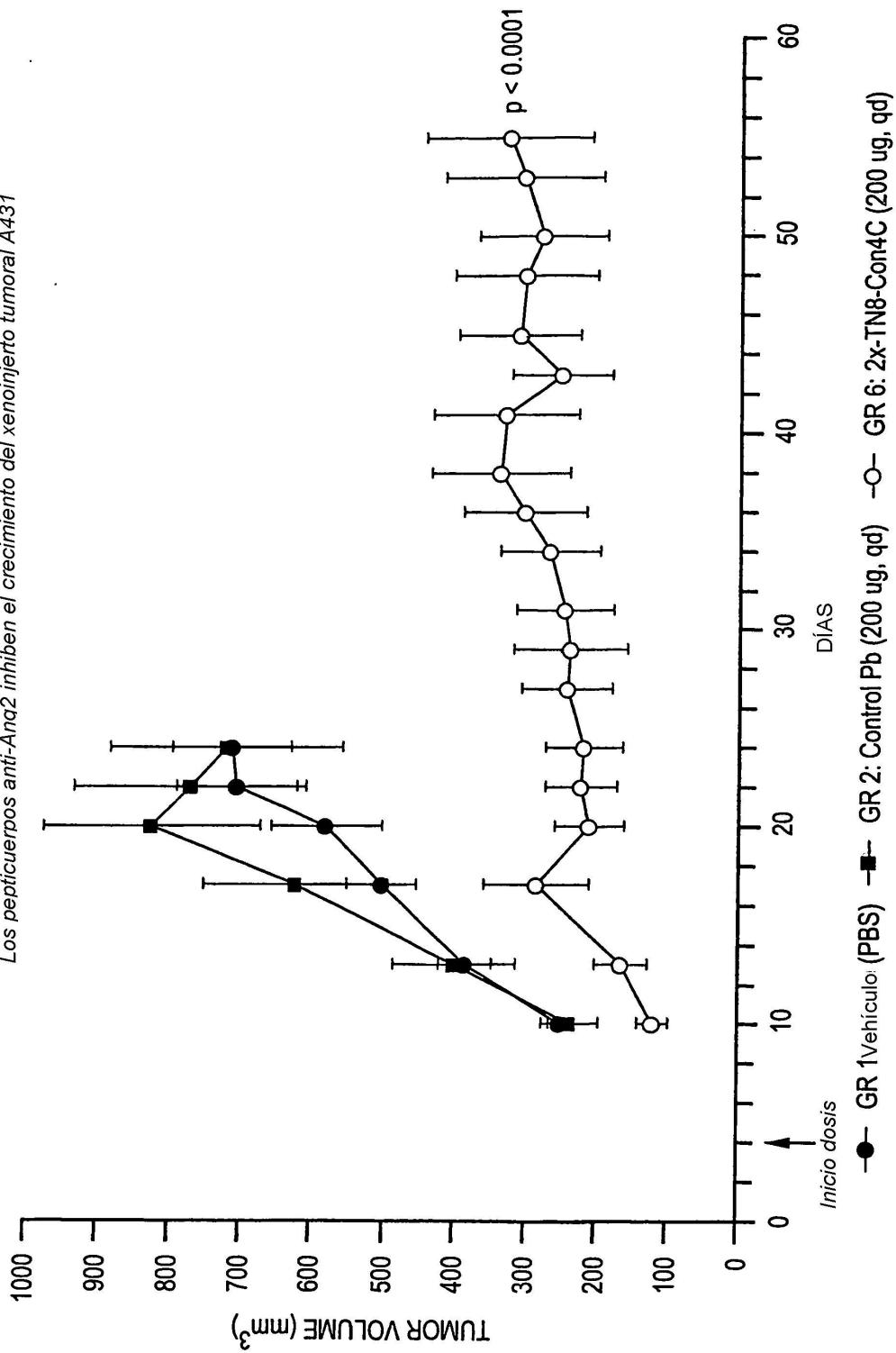


FIG. 4

Peptícuero anti-Ang2 a 1 mg/ml no tiene efecto sobre el crecimiento de las células A431 cultivadas

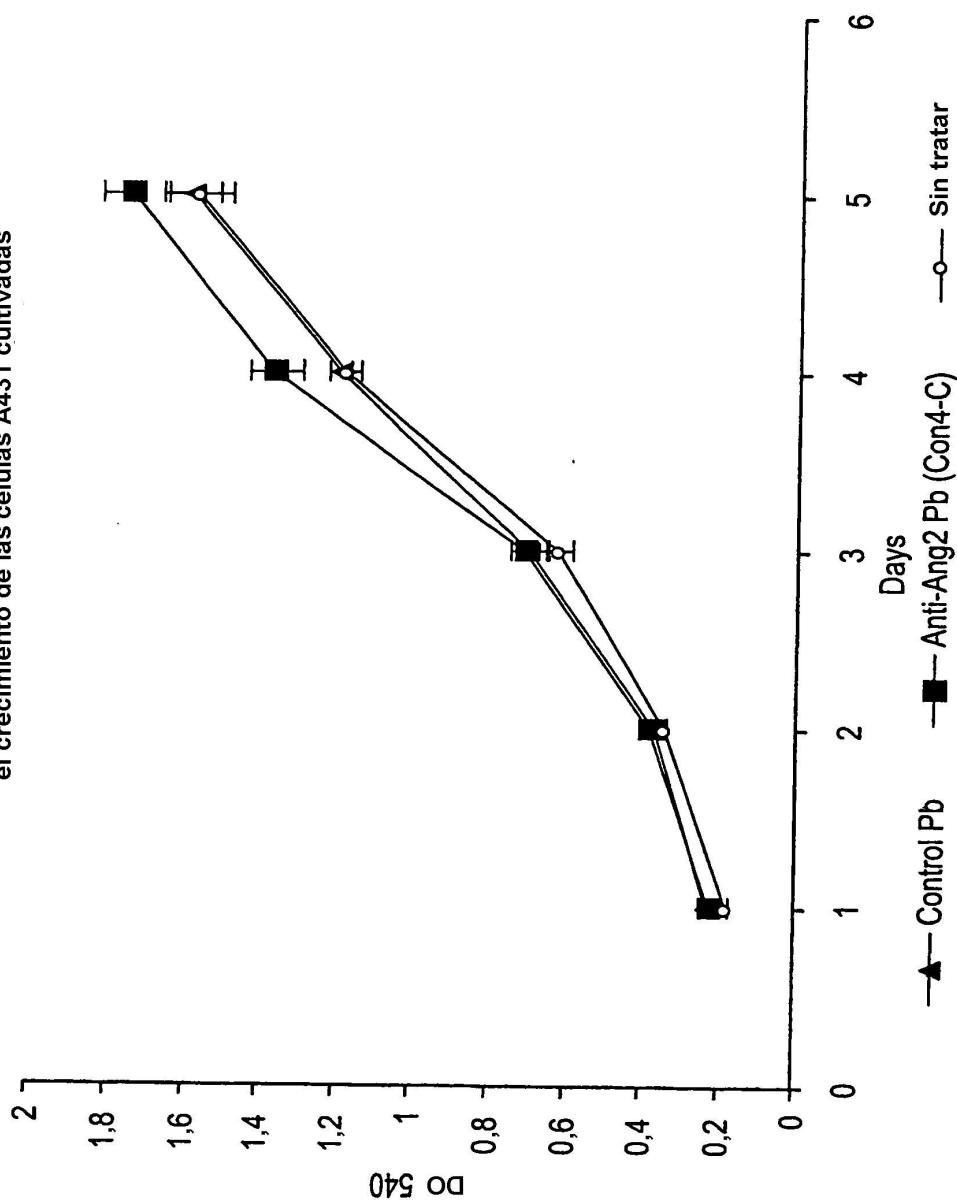


FIG. 5

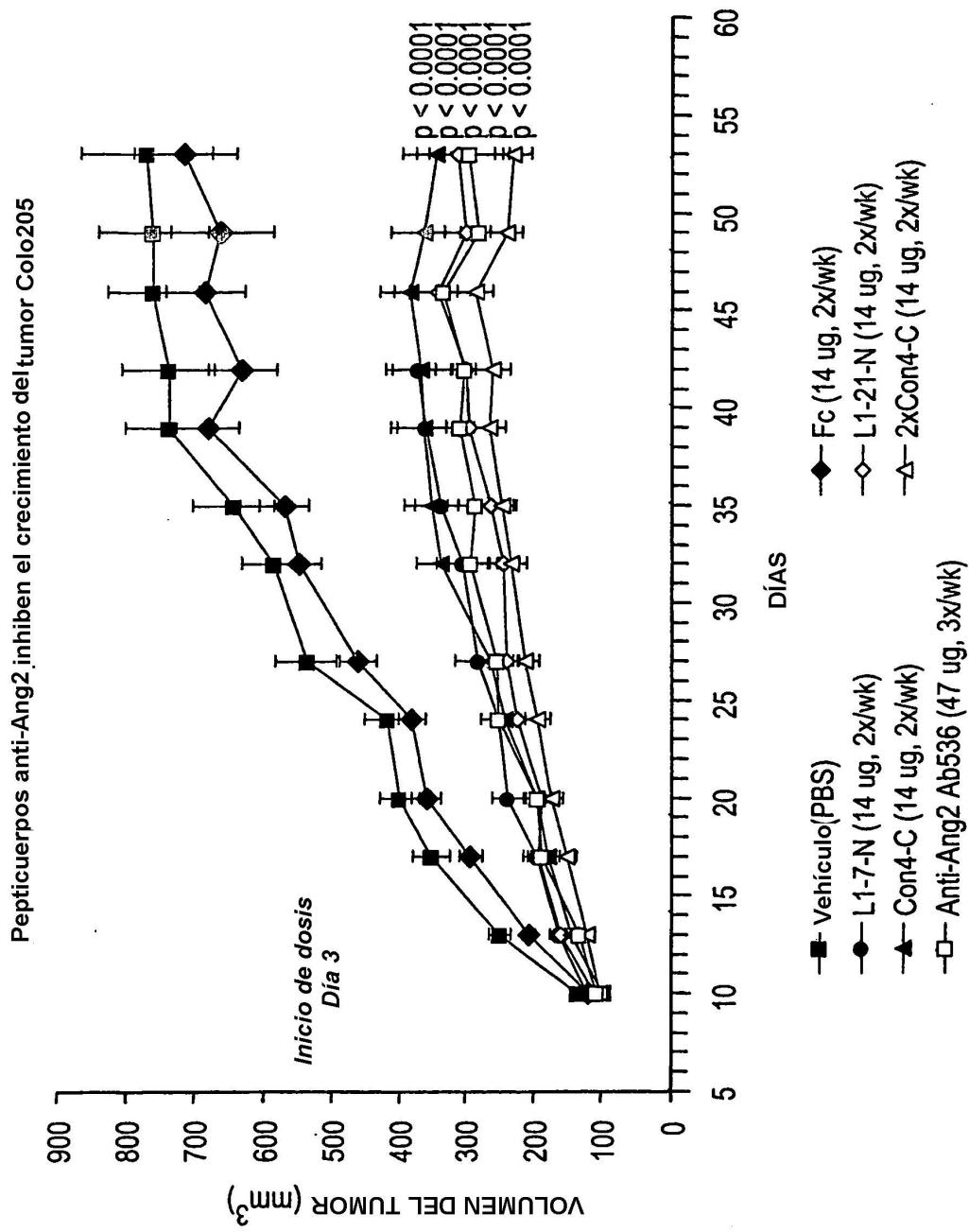


FIG. 6

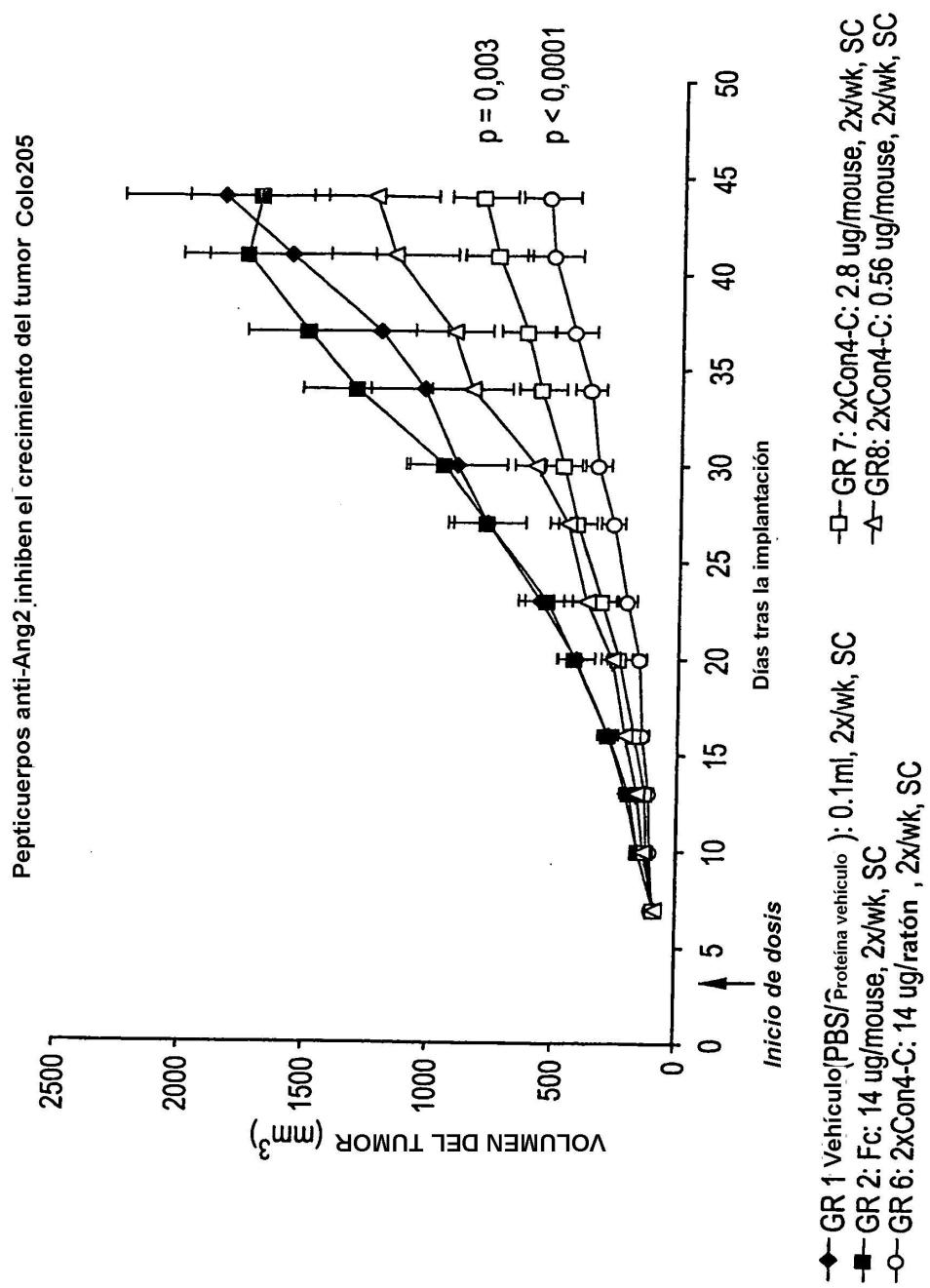


FIG. 7

La terapia con peptícuero anti-Ang2 reduce la densidad de tinción con CD31 de xenoinjertos de tumor Colo205

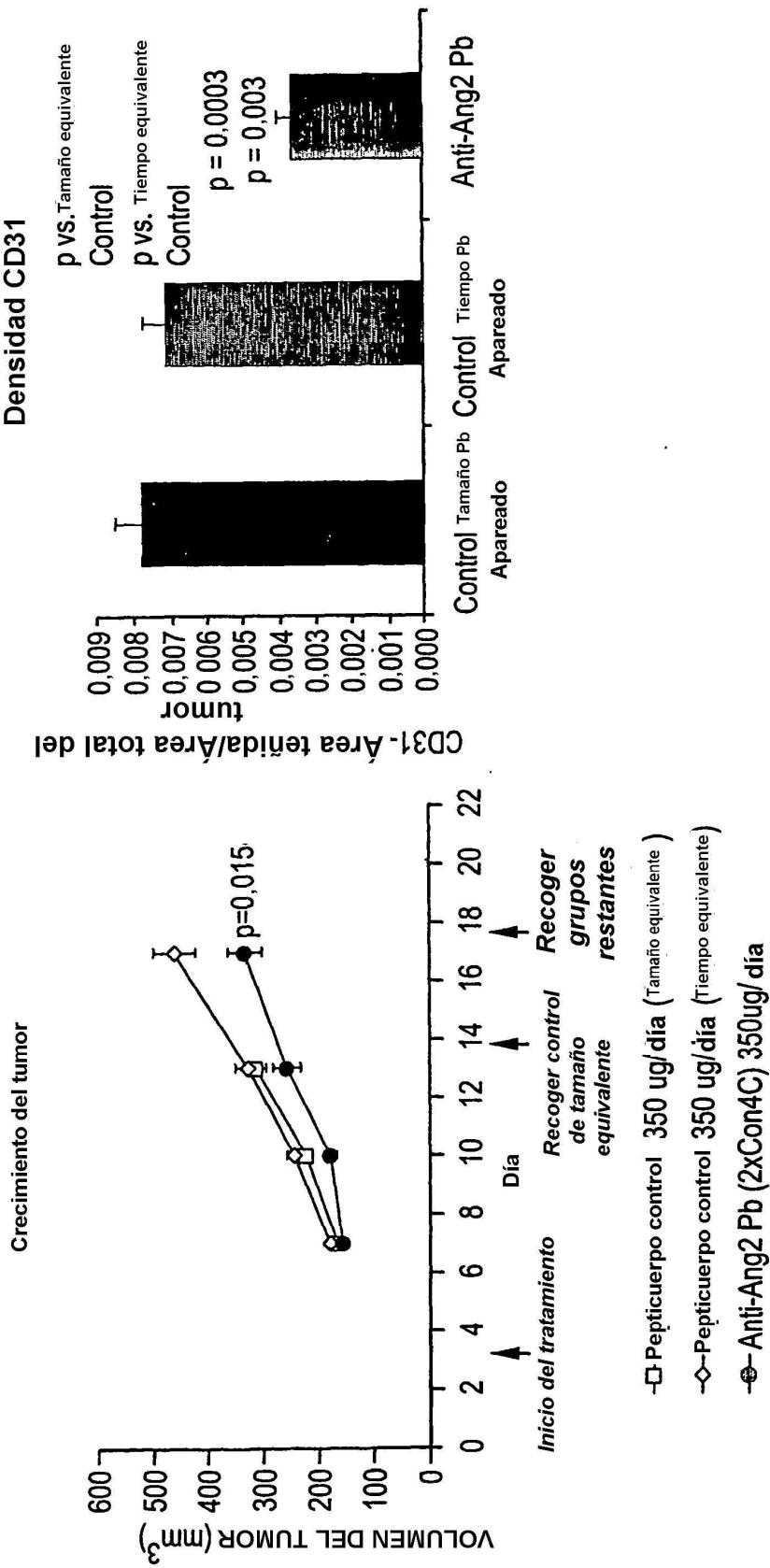


FIG. 8

Los Pb anti-Ang2 inhiben el crecimiento del tumor Colo205, al margen de cuando se inicie la dosis

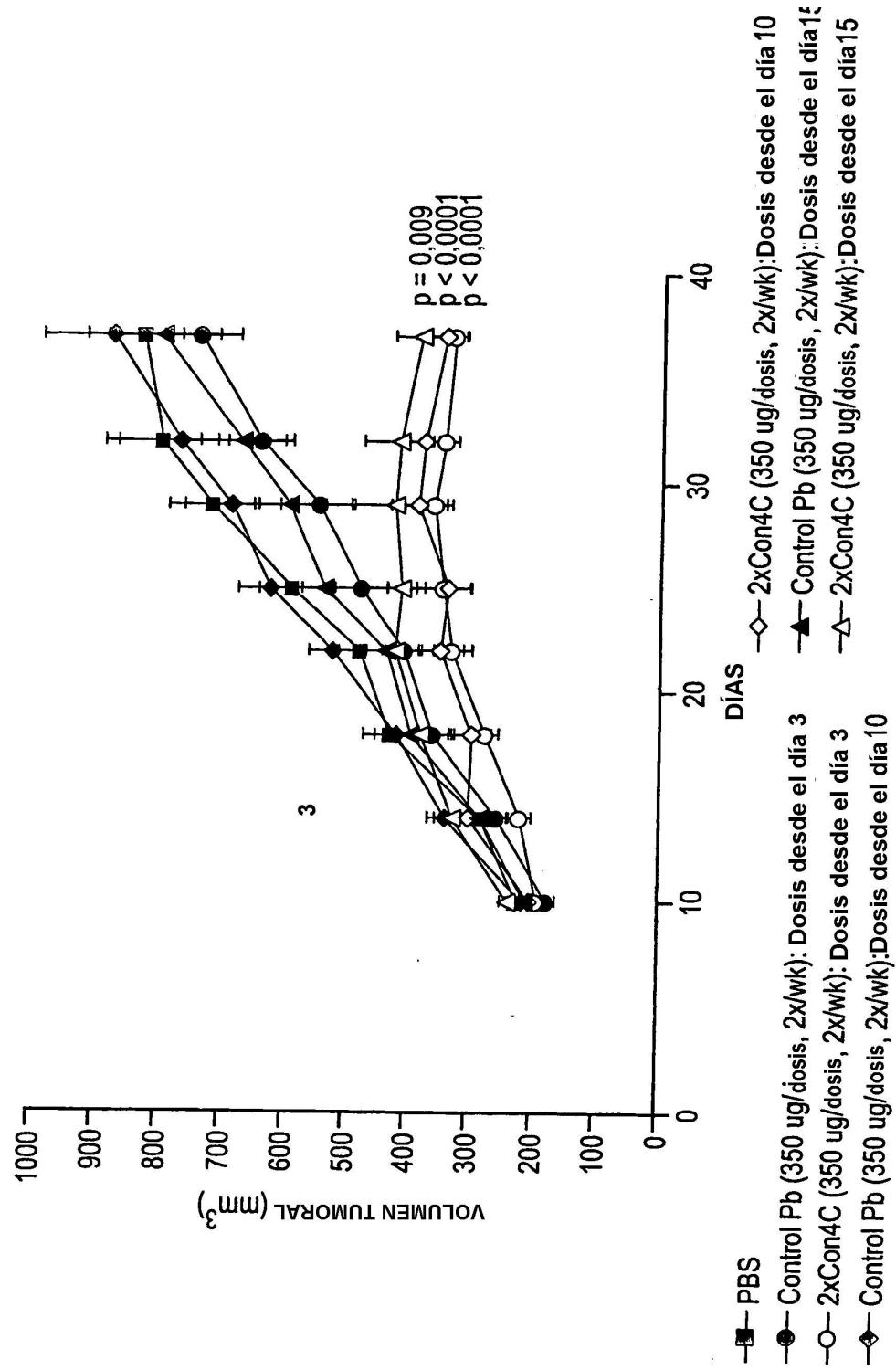


FIG. 9
Tasas de respuesta en estudios de dosis a largo plazo

<u>Estudio</u>	<u>Modelo de tumor</u>	<u>Terapia</u>	<u>Pauta Dosis*</u>	<u>Duración Dosis (semanas)</u>	<u>%RC</u>
082801	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/sem	10	60**
100201	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/sem	11	40**
100201	A431	2xCon4-C	200 ug/día	11	30**
100201	A431	2xCon4-C	40 ug/día	11	0
100201	A431	2xCon4-C	8 ug/día	11	20
012902	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/sem	12	10
012902	Colo205	2xCon4-C	140 ug/sem	12	0
031802	Colo205	2xCon4-C	350 ug, 2x/sem	10	20
111901	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/sem	21	20
042602	Colo205	2xCon4-C	14 ug, 2x/sem	11	21

*En todos los estudios, la dosis comenzó el día 3

**Retirada del fármaco tras RC, no se observó reciclamiento del tumor. Seg, medio 15,3 sem (6-27 sem)

FIG. 10A

Combinación de Pb con taxotere en el modelo de tumor Colo205

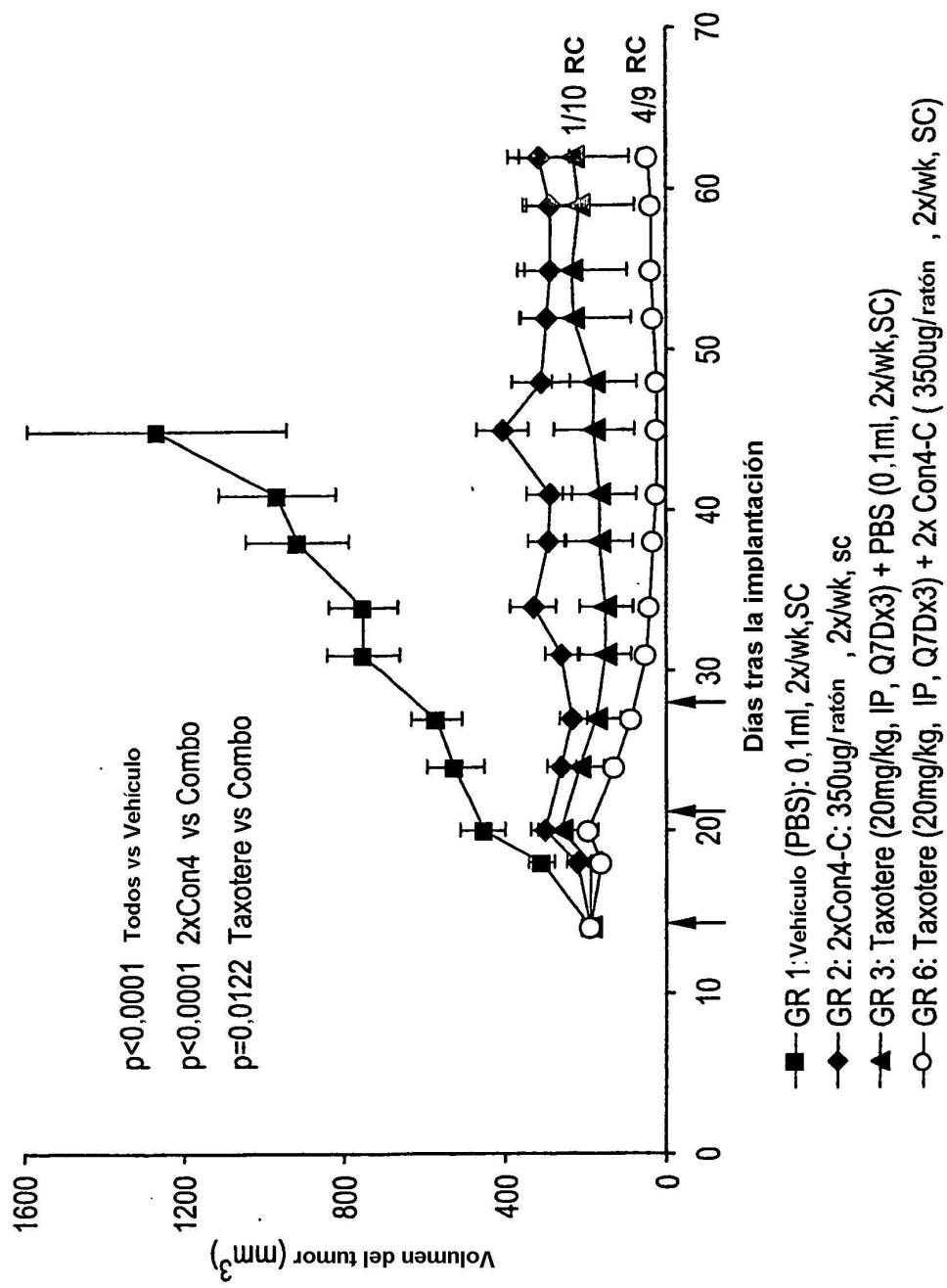


FIG. 10B

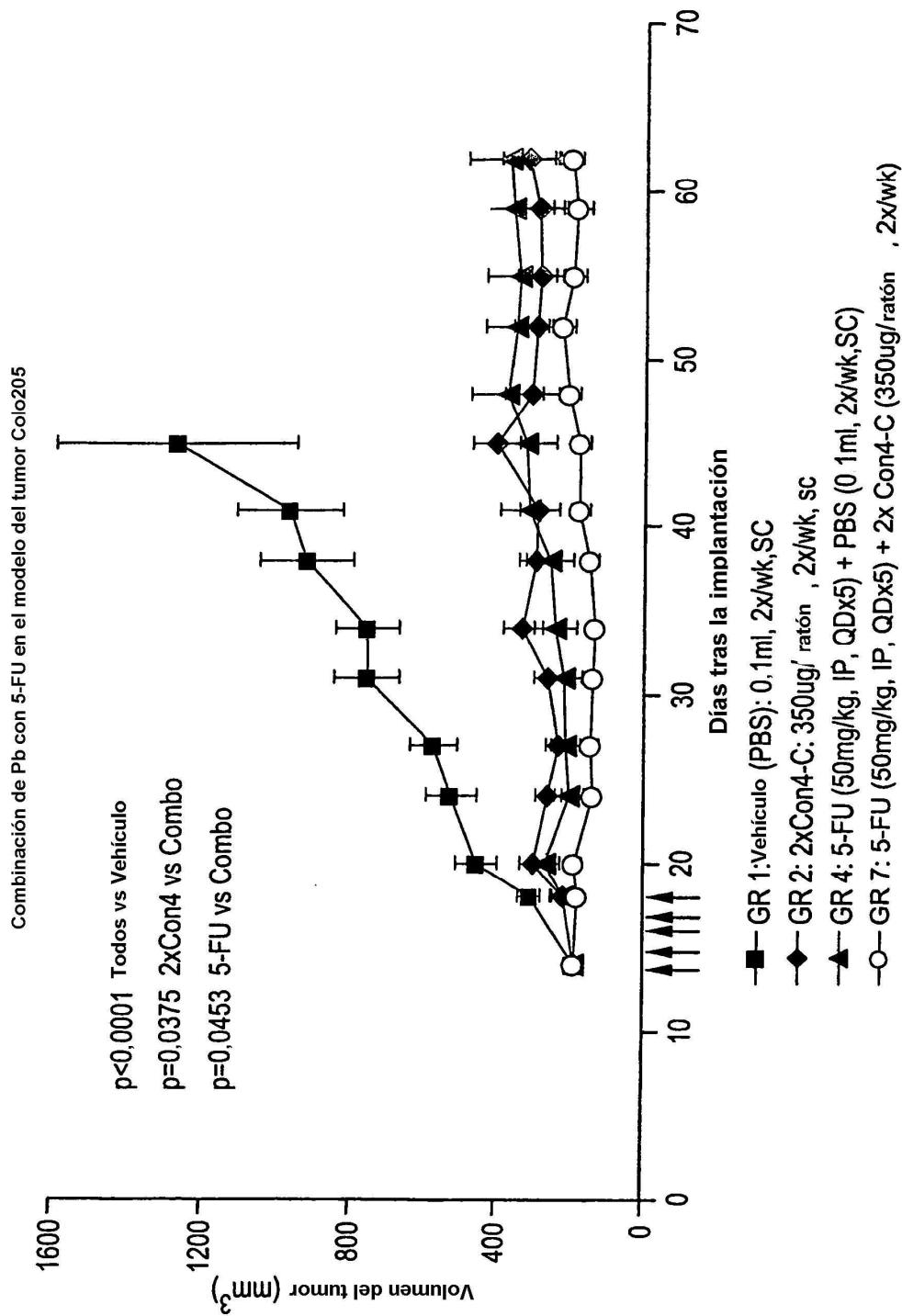


FIG. 11A

Pepticuerpos anti-Ang2 inhiben la inflamación de la pata
en el modelo de artritis inducida por adyuvante

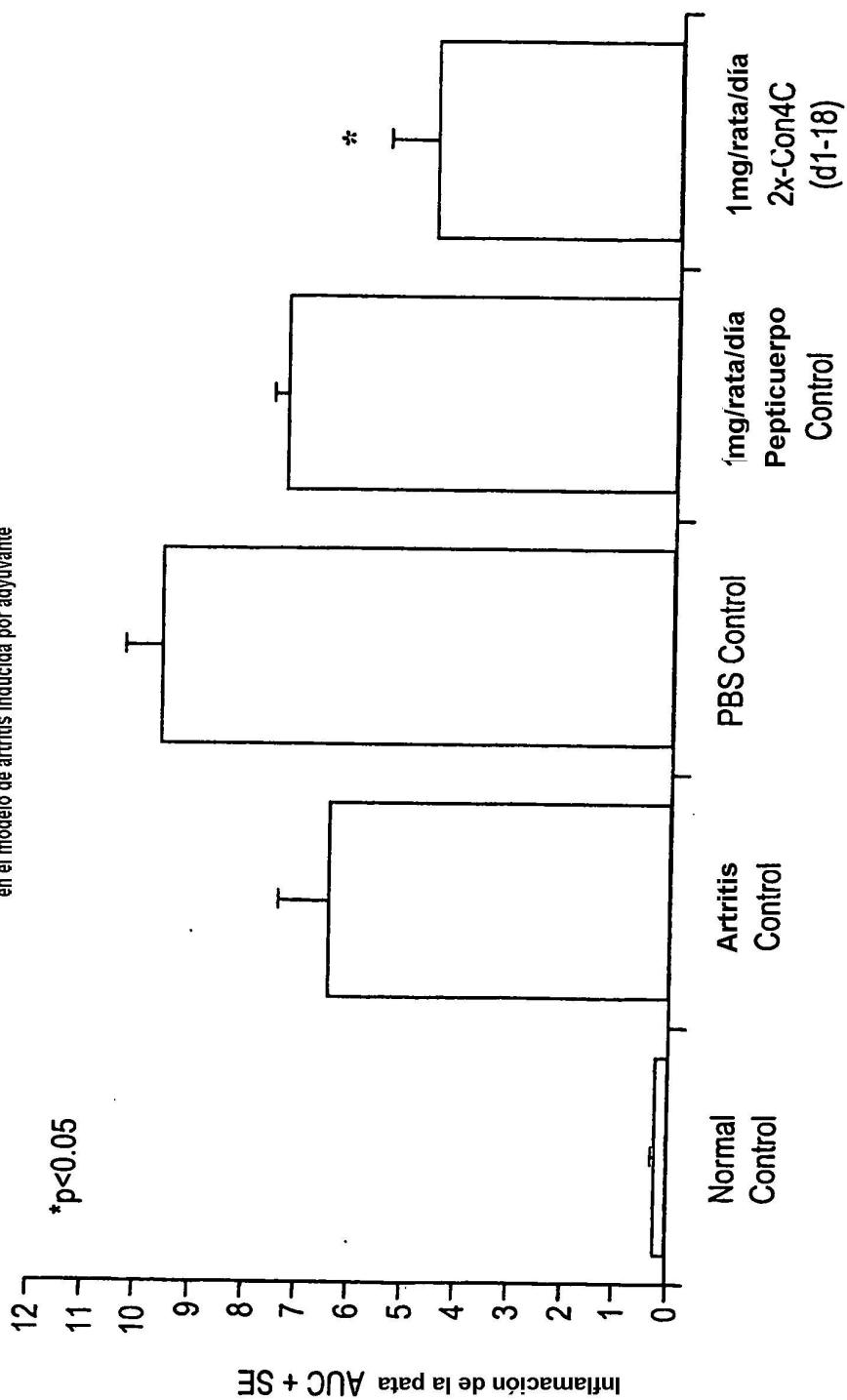


FIG. 11B

Pepticuerpos anti-Ang2 inhiben la pérdida de densidad mineral ósea en el modelo de artritis inducida por adyuvante

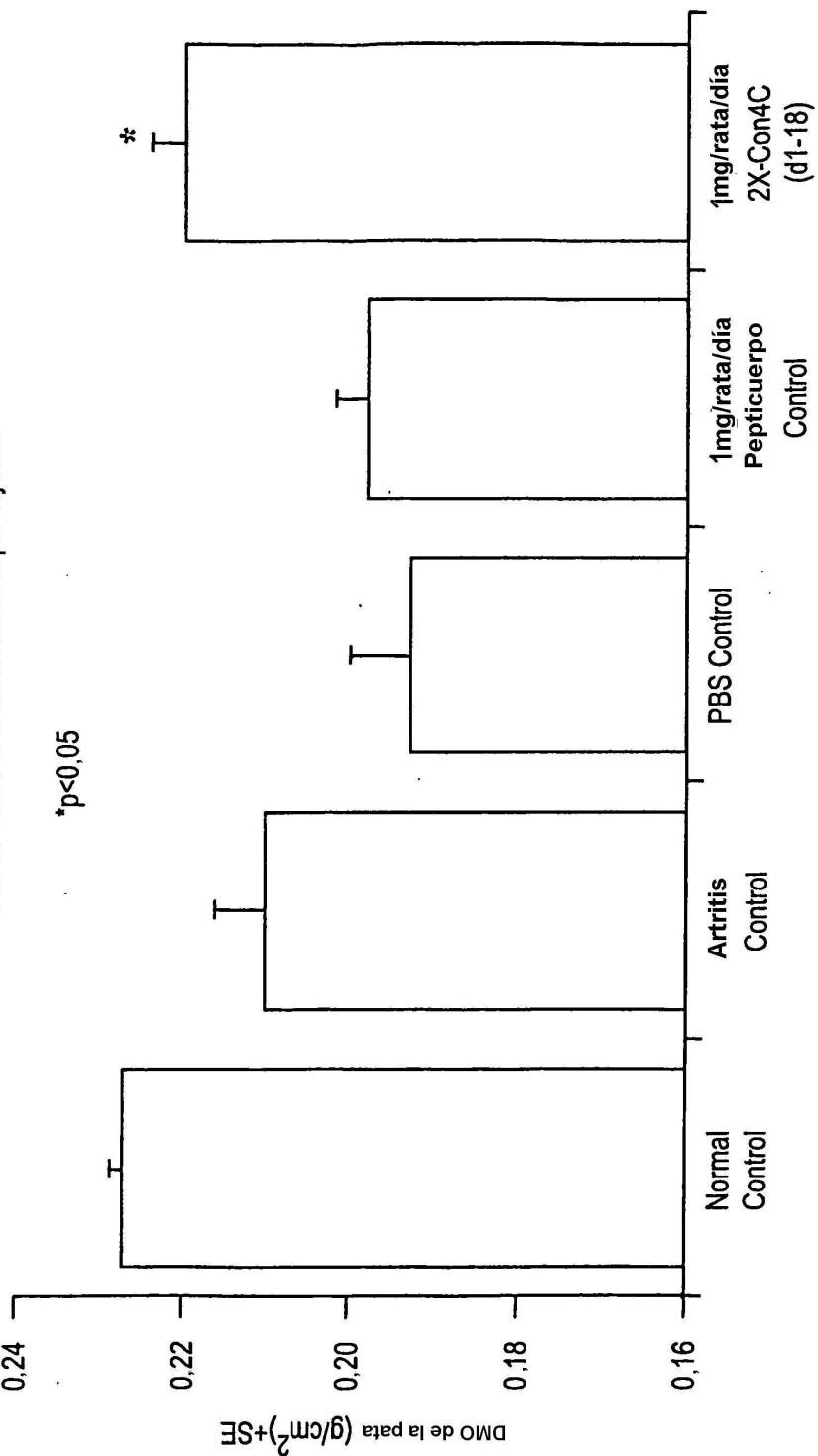


FIG. 11C

Efecto de pepticuerpos anti-Ang2 en la pérdida de peso corporal en el modelo de artritis inducida por adyuvante

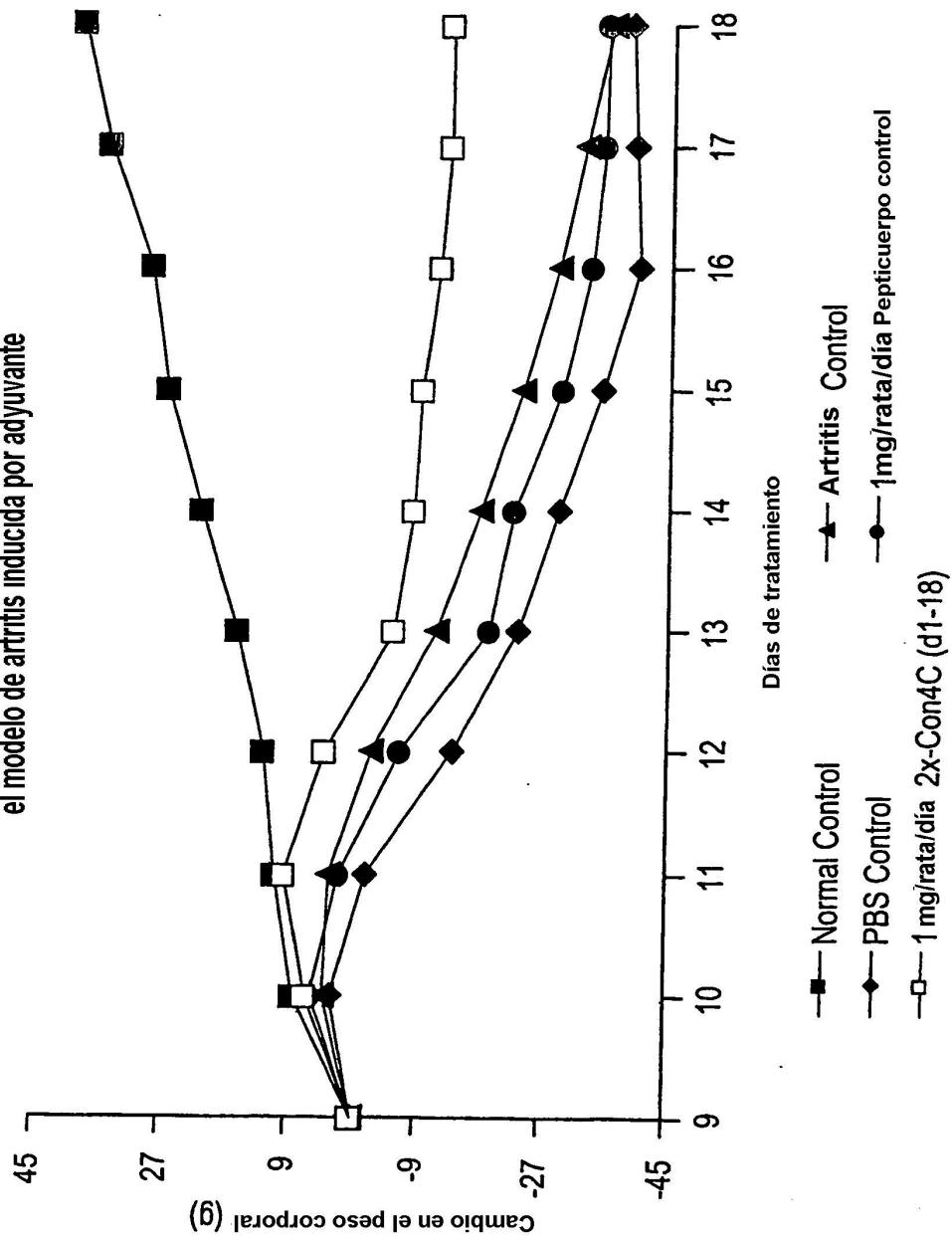


FIG. 12

El pepticuerpo CON4 inhibe la angiogénesis corneana inducida por VEGF

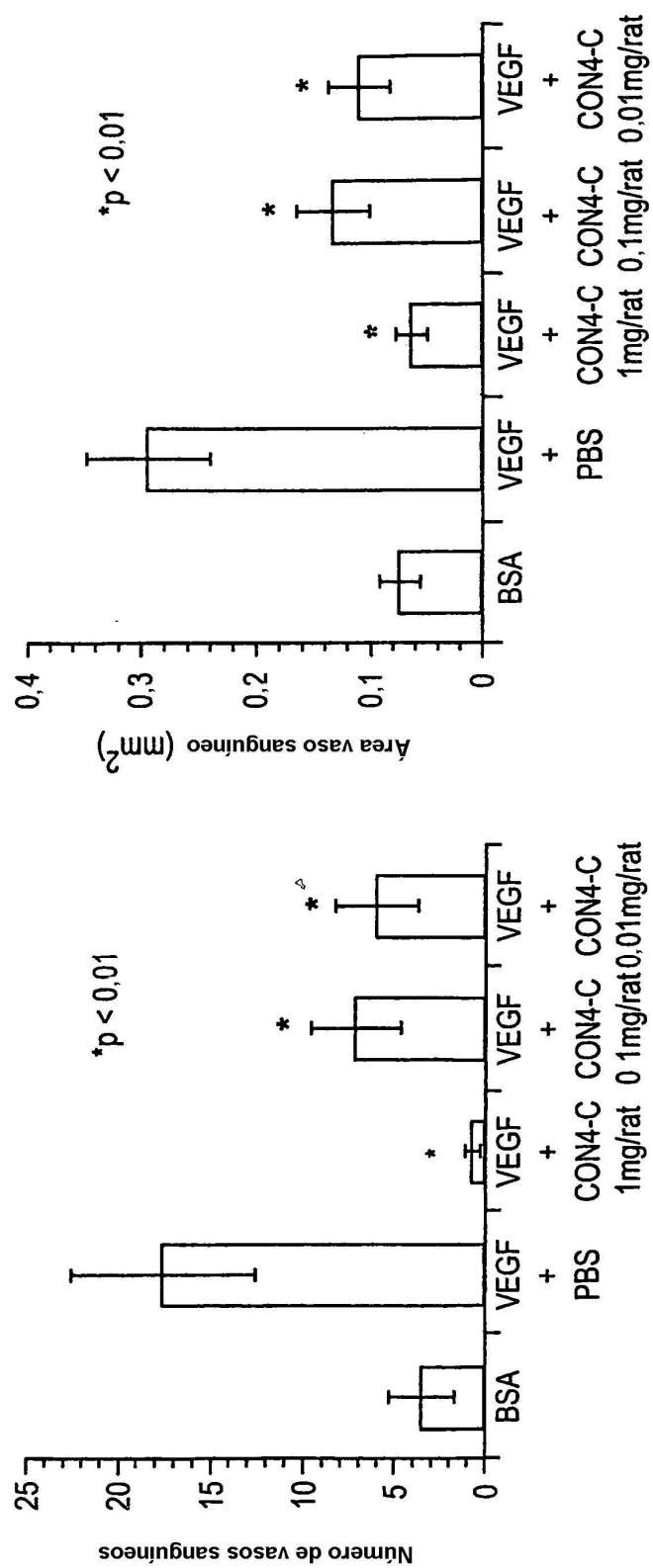


FIG. 13A

Mapeo del epítopo

Unión a hAng2 de longitud completa

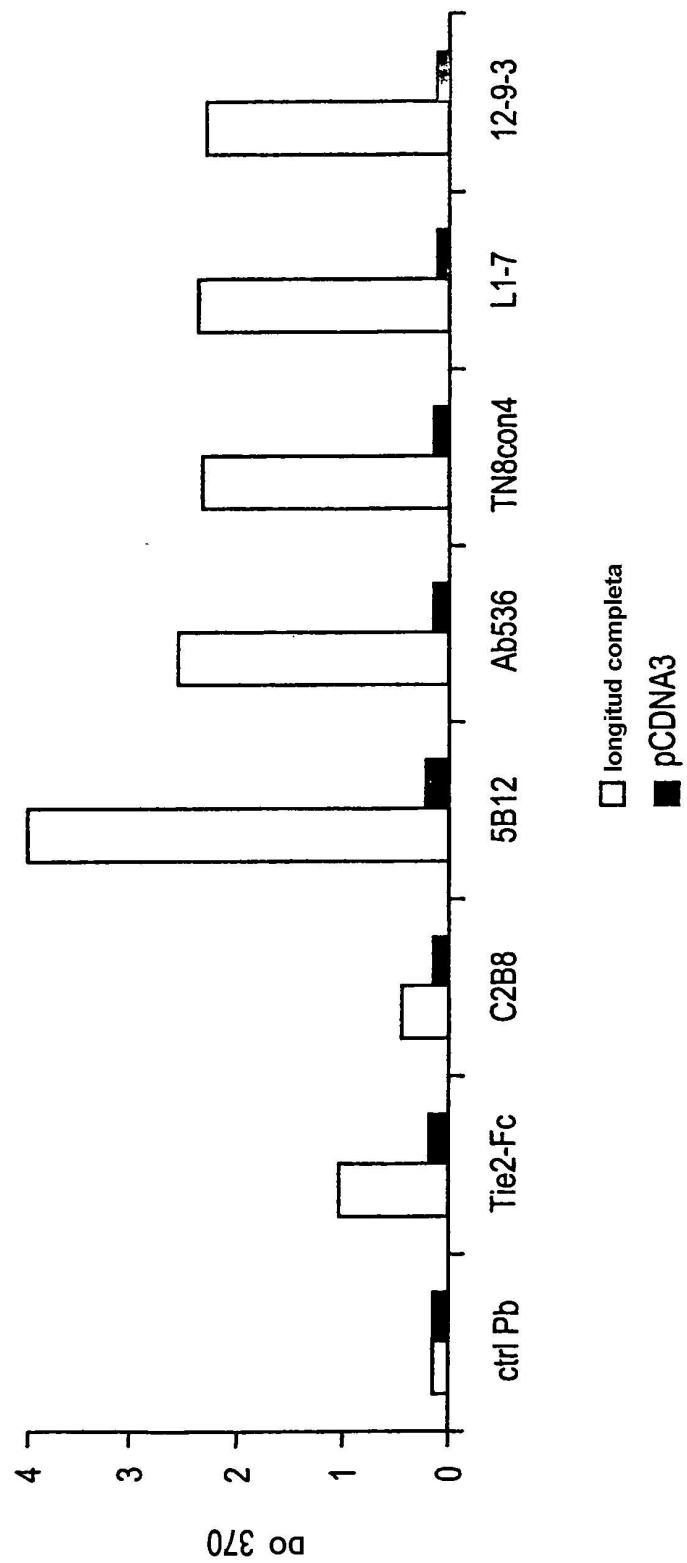


FIG. 13B
Mapeo del epítopo
Unión a hAng2 en N-term
(aa 1-254)

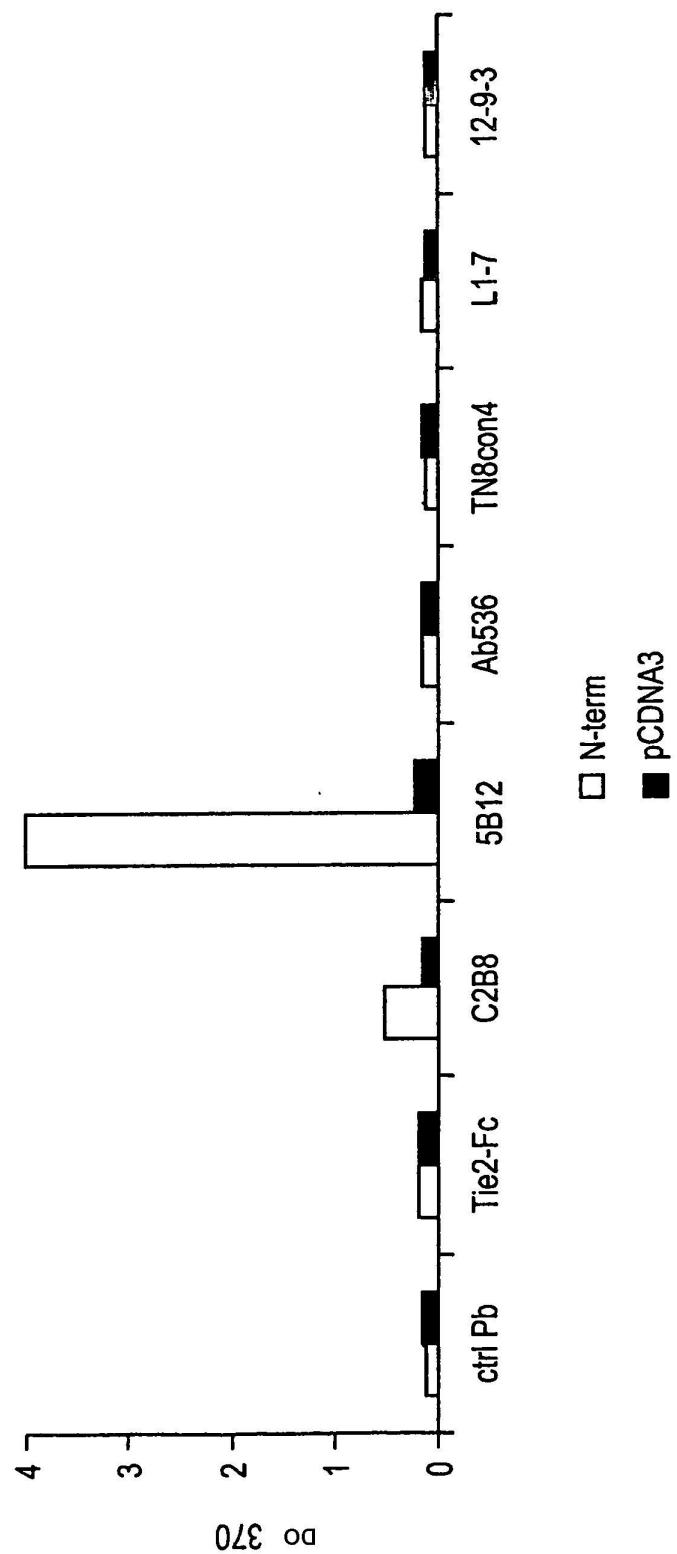


FIG. 13C

Mapeo del epítopo

Unión a hAng2 en C-term

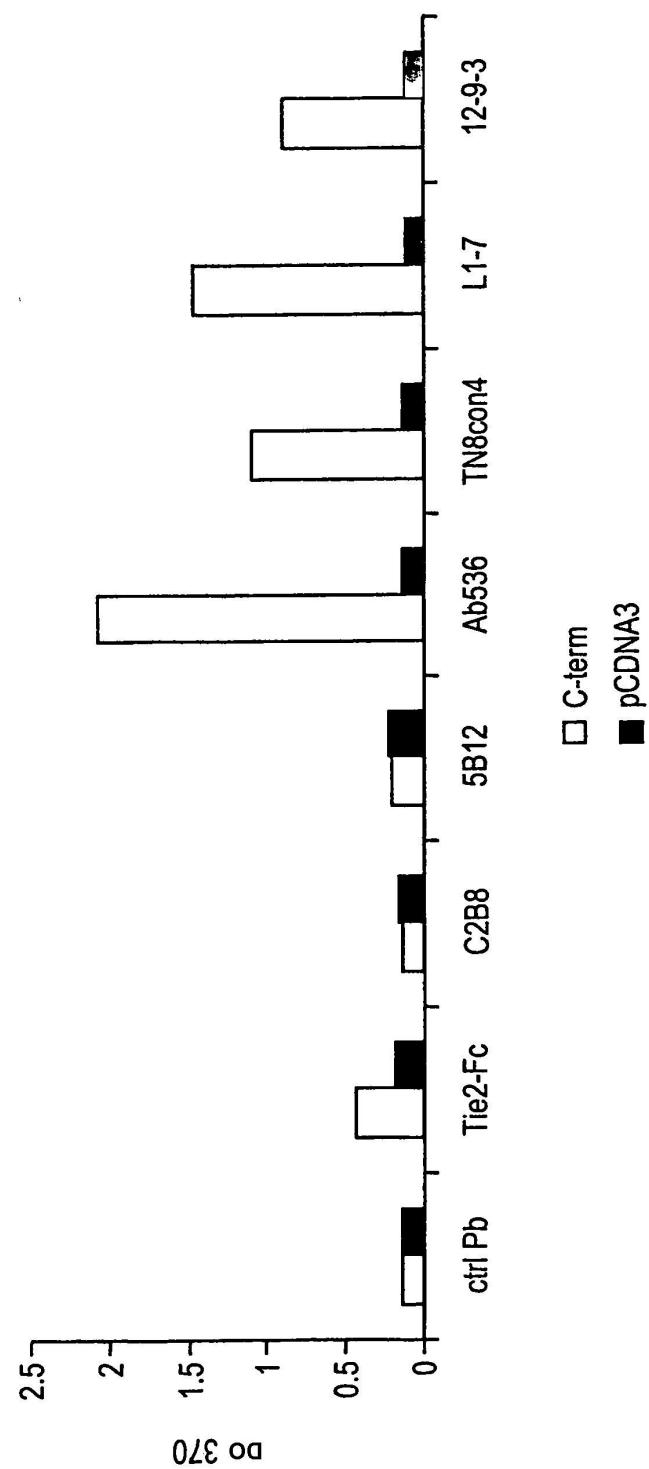


FIG. 14

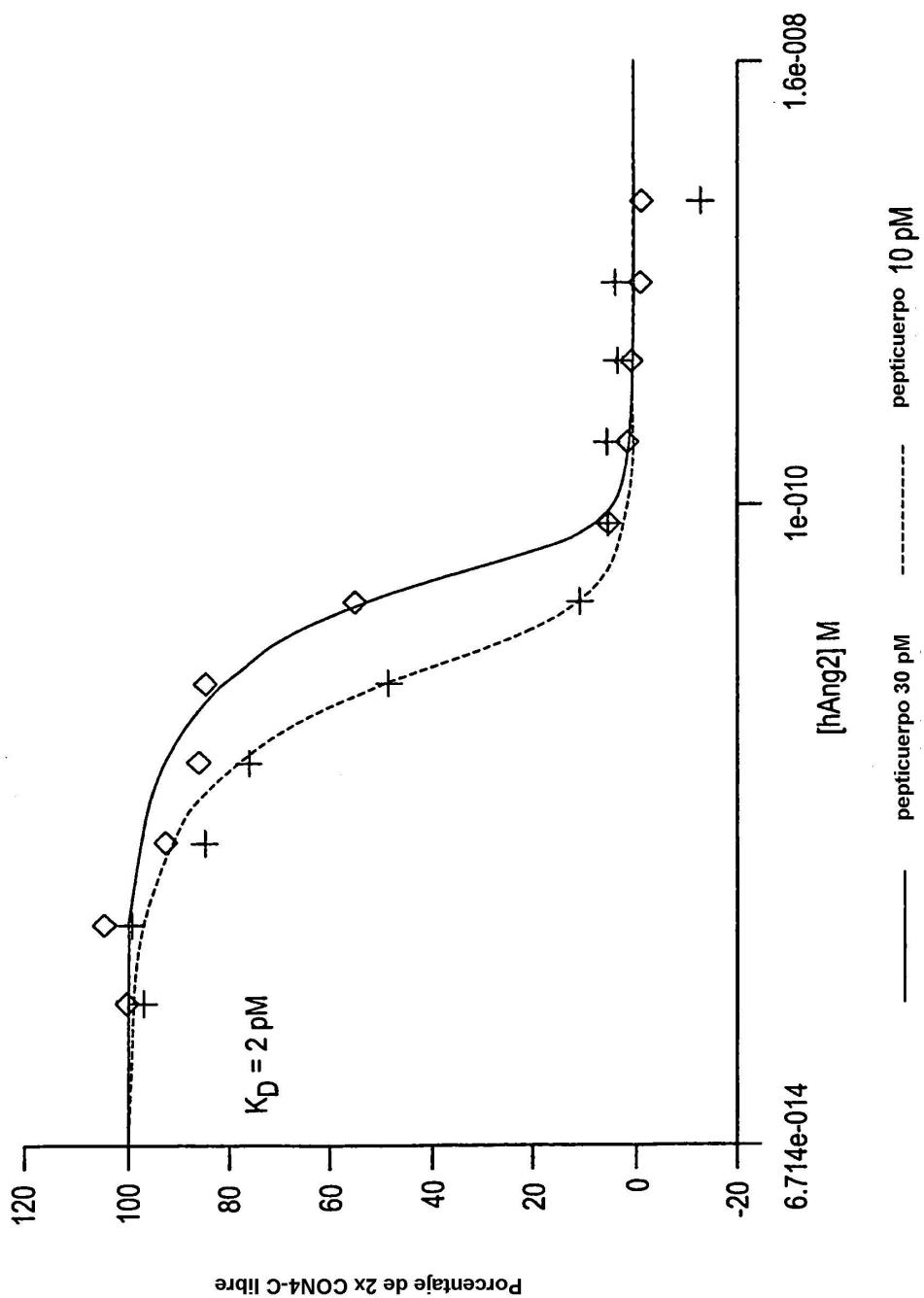


Figura 15

Efecto de sTNF-R1 y AMG 359 sobre la inflamación de la pata en artritis inducida por adyuvante en ratas de Lewis

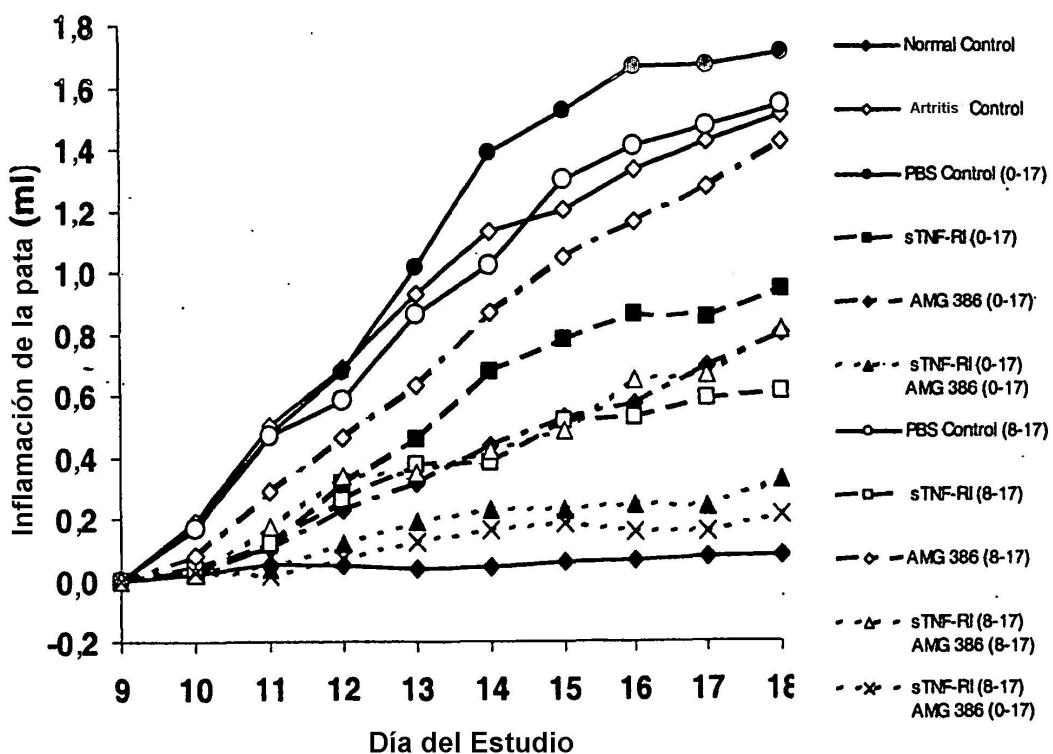


Figura 16

Efecto de sTNF-R1 y AMG 386 sobre la AUC de inflamación de la pata en la artritis inducida por adyuvante en ratas de Lewis

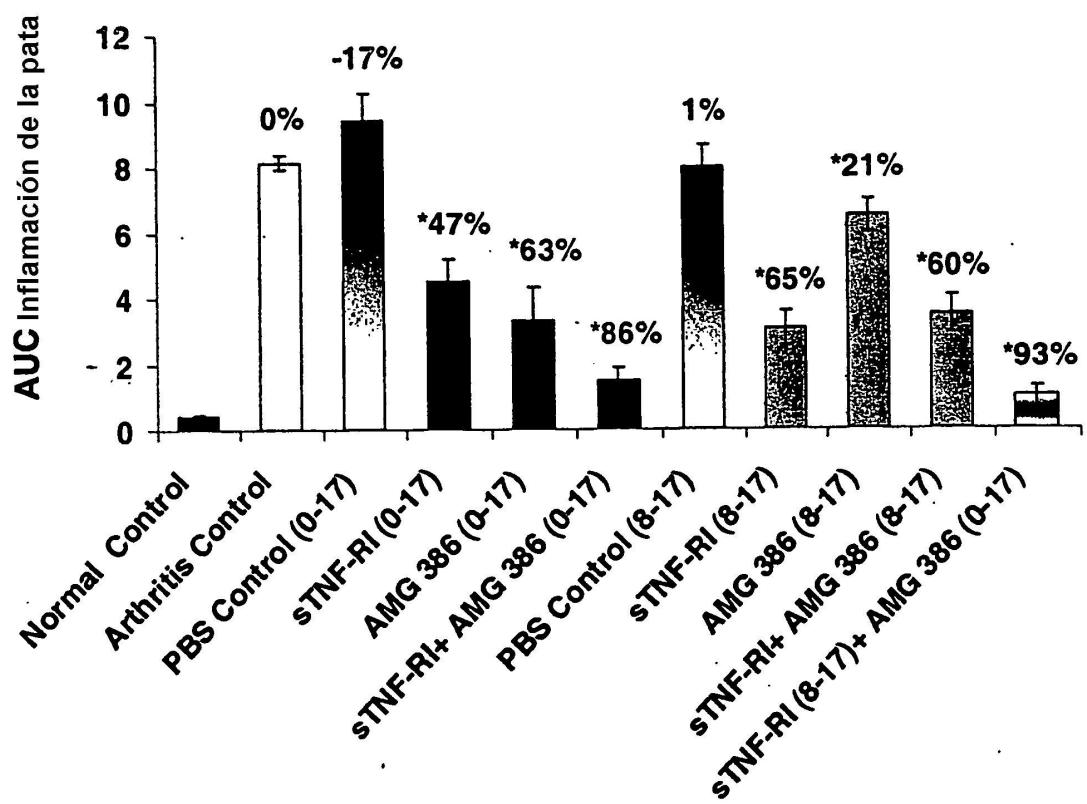


Figura 17

Efecto de sTNF-R1 y AMG 386 sobre el peso corporal en la artritis inducida por adyuvante en ratas de Lewis

