

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 505**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2006 E 06820476 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1962903**

54 Título: **Combinación del antagonista de la angiopoyetina-2 y del antagonista de VEGF-A, y/o KDR, y/o Flt1 para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**15.12.2005 US 750551 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.07.2013**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)  
Milstein Building Granta Park  
Cambridge CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**BROWN, JEFFREY LESTER;  
EMERY, STEPHEN CHARLES y  
BLAKEY, DAVID CHARLES**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 411 505 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

Combinación del antagonista de la angiopoyetina-2 y del antagonista de VEGF-A, y/o KDR, y/o Flt1 para el tratamiento del cáncer

Esta invención se relaciona con las composiciones que poseen actividad anti-angiogénica y son por lo tanto útiles en métodos de tratamiento de enfermedades asociados con la angiogénesis en el cuerpo animal o humano. Más específicamente la invención concierne a una combinación de un antagonista de la actividad biológica de la Angiopoyetina-2 y un antagonista de la actividad biológica de VEGF-A, y/o KDR, y/o Flt1, y los usos de tales antagonistas. Tales combinaciones son también útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad de la Angiopoyetina-2 y VEGF-A, y/o KDR, y/o Flt1.

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente, es un proceso biológico complejo requerido para la formación y funciones fisiológicas virtualmente de todos los órganos. Un elemento esencial de la embriogénesis es el crecimiento fisiológico normal, los procesos patológicos y de reparación tales como la expansión tumoral. Normalmente, la angiogénesis está estrechamente regulada por el equilibrio local de factores angiogénicos y angiostáticos en un proceso de múltiples etapas que implica el crecimiento, la ramificación de los vasos y la formación de túbulos por células endoteliales (que implica procesos tales como la activación de las células endoteliales (EC), la desestabilización de los vasos, la síntesis y liberación de enzimas degradantes, la migración de las EC, la proliferación de las EC, la organización y diferenciación de las EC y la maduración de los vasos).

En el adulto, la angiogénesis fisiológica se limita en gran parte a la cicatrización de heridas y varios componentes de la función reproductiva y el desarrollo embrionario de la hembra. En la angiogénesis relacionada con enfermedades que incluye toda la angiogénesis anormal, indeseable o patológica, el equilibrio local entre factores angiogénicos y angiostáticos se desregula lo que conduce a la formación inadecuada y/o estructuralmente anormal de los vasos sanguíneos. La angiogénesis patológica se ha asociado con estados de enfermedad que incluyen la retinopatía diabética, psoriasis, cáncer, artritis reumatoide, ateroma, sarcoma de Kaposi y hemangioma (Fan y otros, 1995, Trends Pharmacology. Science. 16: 57-66; Folkman, 1995, Nature Medicine 1: 27-31). En cáncer, el crecimiento de tumores primarios y secundarios más allá de 1-2 mm<sup>3</sup> requiere la angiogénesis (Folkman, J. New England Journal of Medicine 1995; 33, 1757-1763).

Muchos sistemas de transducción de señal se han implicado en la regulación de la angiogénesis y se conoce un número de factores como moduladores de la respuesta EC *in vitro* y el crecimiento de los vasos sanguíneos *in vivo*. Los receptores de tirosina cinasas (RTK) son importantes transmisores de señales bioquímicas a través de la membrana plasmática de las células. Estas moléculas de transmembrana, de forma característica, consisten de un dominio de unión al ligando extracelular conectado a través de un segmento en la membrana plasmática a un dominio tirosina cinasa intracelular. La unión del ligando al receptor resulta en la estimulación de la actividad tirosina cinasa asociada al receptor, lo cual conlleva a la fosforilación de los residuos de tirosina tanto en el receptor como en otras moléculas intracelulares. Estos cambios en la fosforilación de la tirosina inician una cascada de señalización que conduce a una variedad de respuestas celulares. Hasta la fecha, se han identificado al menos diecinueve subfamilias distintas de RTK, definidas por homología de secuencia de aminoácidos.

Se cree que el VEGF es un importante estimulador de la angiogénesis normal y la relacionada con la enfermedad (Jakeman, y otros 1993 Endocrinology: 133,848-859; Kolch, y otros 1995 Breast Cancer Research and Treatment: 36,139-155) y la permeabilidad vascular (Connolly, y otros 1989 J. Biol. Chem: 264,20017-20024). El antagonismo de la acción del VEGF mediante el secuestro del VEGF con anticuerpo puede resultar en la inhibición del crecimiento tumoral (Kim, y otros 1993 Nature: 362,841-844). La disrupción heterocigota del gen VEGF resultó en deficiencias fatales en la vascularización (Carmeliet, y otros 1996 Nature 380:435-439; Ferrara, y otros 1996 Nature 380:439-442).

El VEGF es el factor de crecimiento vascular más potente y ubicuo conocido. Antes de la identificación del papel del VEGF como un mitógeno secretado para las células endoteliales, se identificó como un factor de permeabilidad vascular, lo que destacó la capacidad del VEGF para controlar muchos aspectos distintos de comportamiento de las células endoteliales, que incluyen la proliferación, la migración, la especialización y la supervivencia (Ruhrberg, 2003 BioEssays 25:1052-1060). El VEGF, conocido además como el VEGF-A, fue el primer miembro de la familia del VEGF de glicoproteínas diméricas estructuralmente relacionadas que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento derivado de plaqueta que se identificó. Además del miembro fundador, la familia del VEGF incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento placentario (PlGF) y el VEGF derivado de glándula endocrina (EG-VEGF). Las formas activas de VEGF se sintetizan ya sea como homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia VEGF. El VEGF-A existe en seis isoformas generadas mediante el corte y empalme alternativo; VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>.

Esas isoformas difieren principalmente en su biodisponibilidad, la isoforma predominante es el VEGF<sub>165</sub> (Podar, y otros 2005 Blood 105(4):1383-1395). La regulación del corte y empalme durante la embriogénesis para producir proporciones específicas de la etapa y del tejido de las diversas isoformas crea rico potencial para comportamientos distintos y dependientes del contexto de las células endoteliales en respuesta al VEGF.

5

Se sabe que los miembros de la familia del VEGF se unen con diferentes afinidades a tres receptores tirosina cinasa relacionados; el VEGFR1 (el receptor de tirosina cinasa de tipo fms, Flt o Flt1), el VEGFR2 (el receptor que contiene la inserción de dominio de cinasa, el KDR (además denominado como Flk-1)), y el VEGFR3 (otro receptor tirosina cinasa de tipo fms, Flt4). Dos de estos RTK relacionados, Flt1 y KDR, han mostrado unirse al VEGF con alta afinidad (De Vries y otros, 1992, Science 255: 989-991; Terman y otros, 1992, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1992, 187: 1579-1586). La unión del VEGF a estos receptores expresados en células heterólogas ha estado asociada con cambios en el estado de fosforilación de la tirosina en las proteínas celulares y en los flujos de calcio.

10

15

Los estudios en ratones knock-out han demostrado que la alteración en cualquiera de Flt1 o KDR, causa la muerte a la mitad de la gestación debido a defectos vasculares agudos. Sin embargo, los fenotipos son distintos; la deficiencia de KDR conduce a una falta de EC y de un sistema hematopoyético en desarrollo (Shalaby, y otros. 1995 Nature 376:62-66), la deficiencia de Flt1 no afecta los progenitores hematopoyéticos y las EC, pero estas no pueden ensamblarse en vasos funcionales (Fong, y otros. 1995 Nature 376:66-70). Flt4 se expresa ampliamente en el embrión antes de restringirse a los vasos linfáticos en los adultos. Los ratones knock-out de Flt4 mostraron un papel esencial para Flt4 en el desarrollo temprano del sistema cardiovascular, en la remodelación y maduración de las redes vasculares primarias en vasos sanguíneos más grandes (Dumont, y otros. 1998 Science 282:946-949).

20

Además de la familia del VEGF, se cree que las angiopoyetinas están implicadas en el desarrollo vascular y la angiogénesis posnatal. Las angiopoyetinas incluyen un agonista de de origen natural, angiopoyetina-1 (Angiopoyetina-1), así como un antagonista de de origen natural, angiopoyetina-2 (Angiopoyetina-2). Se piensa que la función de la Angiopoyetina-1 es ser conservada en el adulto, donde se expresa amplia y constitutivamente (Hanahan, Science, 277:48-50 (1997); Zagzag, y otros, Exp Neurology, 159:391-400 (1999)). Por el contrario, la expresión de la Angiopoyetina-2 se limita principalmente a los sitios de remodelación vascular donde se piensa que bloquea la estabilización constitutiva o función de maduración de la Angiopoyetina-1, lo que permite a los vasos volver a, y permanecer en, un estado plástico que pueden ser más sensibles a las señales de crecimiento (Hanahan, 1997; Holash y otros, Oncogene 18:5356-62 (1999); Maisonpierre, 1997). Los estudios de la expresión de la Angiopoyetina-2 en la angiogénesis relacionada con la enfermedad encontraron que muchos tipos de tumores muestran expresión de la Angiopoyetina-2 vascular (Maisonpierre y otros, Science 277:55-60 (1997)). Los estudios funcionales sugieren que la Angiopoyetina-2 está involucrada en la angiogénesis tumoral y asocian la sobreexpresión de la Angiopoyetina-2 con el crecimiento aumentado del tumor en un modelo de xenoinjerto de ratón (Ahmad, y otros, Cancer Res., 61:1255-1259 (2001)). Otros estudios han asociado la sobreexpresión de la Angiopoyetina-2 con la hipervascularidad del tumor (Etoh, y otros, Cancer Res. 61:2145-53 (2001); Tanaka y otros, Cancer Res. 62:7124-29 (2002)).

25

30

35

Usando los enfoques de clonación basados en la homología, Valenzuela y otros (1999) identificaron 2 nuevas Angiopoyetinas: la angiopoyetina-3 (Angiopoyetina-3) en ratón, y la angiopoyetina-4 (Angiopoyetina-4) en humanos. Aunque la Angiopoyetina-3 y la Angiopoyetina-4 son estructuralmente más divergentes entre sí de lo que lo son las versiones de ratón y humana de Angiopoyetina-1 y Angiopoyetina-2, ellas parecen representar los homólogos de ratón y humano del mismo locus del gen. Muy poco se sabe sobre la biología de estos miembros de la familia de la Angiopoyetina. Por ejemplo, la Angiopoyetina-4 se expresa en niveles altos sólo en el pulmón, sin embargo ninguna de las acciones biológicas o vías de señalización activadas por la Angiopoyetina-4 se pueden encontrar en la literatura (Tsigkos, y otros, Expert Opin. Investig. Drugs 12(6): 933-941 (2003); Valenzuela, y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 96:1904-1909 (1999)). Se conoce que los niveles de expresión de la Angiopoyetina-4 aumentan en respuesta a la hipoxia, y los factores de crecimiento de células endoteliales conducen al aumento de los niveles de expresión de la Angiopoyetina-4 en una línea celular de glioblastoma y las células endoteliales. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de regulación de la expresión, y el efecto resultante sobre la angiogénesis fisiológica y las enfermedades relacionadas (Lee, y otros, FASEB J. 18: 1200-1208 (2004)).

40

45

50

Las angiopoyetinas se descubrieron primero como ligandos para la familia del receptor tirosina cinasa Tie que se expresa selectivamente dentro del endotelio vascular (Yancopoulos y otros, Nature 407:242-48 (2000)). La Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-2, Angiopoyetina-3 y Angiopoyetina-4 se unen principalmente al receptor Tie-2 y por lo tanto se conocen además como ligandos Tie-2. La unión de la Angiopoyetina-1 a Tie-2 induce la fosforilación de tirosina del receptor a través de la autofosforilación y posteriormente la activación de sus vías de señalización a través de la transducción de señales (Maisonpierre, P. y otros, 1997 Science: 277, 55-60). La Angiopoyetina-2 es un antagonista de origen natural para la

55

Angiopoyetina-1 que actúa a través de la inhibición competitiva de la activación de la cinasa inducida por la Angiopoyetina-1 del receptor Tie-2 (Hanahan, 1997; Davis y otros, Cell 87:1161-69 (1996); Maisonpierre y otros, Science 277:55-60 (1997)).

5 Los estudios con ratones knock-out de Tie-2 y Angiopoyetina-1 muestran fenotipos similares y sugieren que la Angiopoyetina-1 estimuló que la fosforilación de Tie-2 medie la remodelación y estabilización del desarrollo de los vasos, lo que promueve la maduración de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis y el mantenimiento de la adhesión célula endotelial -célula soporte (Dumont y otros, Genes & Development, 8:1897-1909 (1994); Sato, Nature, 376:70-74 (1995); (Thurston, G. y otros, 2000 Nature Medicine: 6, 460-463)).

10 En los años recientes la Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-2 y/o Tie-2 se han propuesto como posibles blancos terapéuticos contra el cáncer. Por ejemplo US6166185, US5650490 y US5814464 cada una describe anticuerpos del receptor y ligando anti-Tie-2. Se reportó que los estudios que usan Tie-2 soluble disminuyen el número y tamaño de los tumores en roedores (Lin, 1997; Lin 1998). Siemester y otros (1999) generaron líneas celulares de melanoma humano que expresaban el dominio extracelular de Tie-2, inyectaron estos ratones desnudos e informaron que Tie-2 soluble resultó en una inhibición significativa del crecimiento tumoral y la angiogénesis tumoral. Dado que ambos la Angiopoyetina-1 y Angiopoyetina-2 se unen a Tie-2, no es claro a partir de estos estudios si la Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-2 o Tie-2 pudieran ser un blanco atractivo para la terapia contra el cáncer. Sin embargo, se cree que la terapia anti-Angiopoyetina-2 eficaz será de beneficio en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer, en el que la progresión depende de la angiogénesis aberrante donde el bloqueo del proceso puede conducir a la prevención del avance de la enfermedad (Folkman, J., Nature Medicine. 1: 27-31 (1995). Adicionalmente, algunos grupos informaron el uso de anticuerpos que se unen a la Angiopoyetina-2, ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,166,185 y la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2003/0124129 A1. El estudio del efecto de la expresión focal de la Angiopoyetina-2 ha mostrado que antagonizar la señal de Angiopoyetina-1/Tie-2 afloja la estructura vascular apretada, y de ese modo expone las EC a las señales de activación de inductores de la angiogénesis, por ejemplo, VEGF (Hanahan, 1997). Este efecto pro-angiogénico que resulta de la inhibición de la Angiopoyetina-1 indica que la terapia de anti-Angiopoyetina-1 no sería un tratamiento eficaz contra el cáncer.

15 La publicación internacional número WO200197850 describe la combinación de la interferencia funcional con sistemas del receptor VEGF/VEGF y sistemas del receptor Angiopoyetina/Tie para la inhibición de la vascularización y del crecimiento tumoral. El amplio alcance incluye cualquier combinación concebible de interferencia funcional de cualquier componente de los sistemas de receptores VEGF/VEGF y el sistema del receptor Angiopoyetina/Tie; o sea cualquiera de Flt1, KDR, Flt4, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PIGF o EG-VEGF combinado con la interferencia funcional de cualquiera de la Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-2, Angiopoyetina-3, Angiopoyetina-4 o Tie-2.

20 La solicitud sugiere que la interferencia funcional puede alcanzarse por

- 35
- i) compuestos que inhiben la actividad del receptor tirosina cinasa,
  - ii) compuestos que inhiben la unión del ligando a los receptores,
  - iii) compuestos que inhiben la activación de la rutas intracelulares del receptor,
  - 40 iv) compuestos que inhiben o activan la expresión de un ligando o de un receptor del sistema del receptor VEGF o Tie,
  - v) sistemas de suministro tales como anticuerpos, ligandos, oligonucleótidos u oligopéptidos de alta afinidad de unión, o liposomas con agentes citotóxicos objetivo o agentes que inducen la coagulación para el endotelio a través del reconocimiento de los sistemas del receptor VEGF/VEGF o del receptor Angiopoyetina/Tie, o
  - 45 vi) sistemas de suministro tales como anticuerpos, ligandos, oligonucleótidos u oligopéptidos de alta afinidad de unión, o liposomas, que se dirigen al endotelio e inducen necrosis o apoptosis.

50 Para ampliar aún más el alcance reivindicado, la solicitud declara además que el compuesto comprendido por las combinaciones de la presente invención puede ser una sustancia de pequeño peso molecular, un oligonucleótido, un oligopéptido, una proteína recombinante, un anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de los mismos. La inclusión de un gran número de combinaciones opcionales no enseña la utilidad/selección de combinaciones particulares.

Aunque WO200197850 reivindica un alcance muy amplio, la ejemplificación de la invención se limita a combinaciones del dominio neutralizante del ligando extracelular del receptor tirosina cinasa Tie-2 humano (sTie-2) y A o B. El último puede ser:

- 55 A. inhibidor del receptor tirosina cinasa VEGF hidrógeno succinato de (4-clorofenil)[4-(4-piridilmetilo)-ftalazin-1-il] amonio (Wood y otros, Cancer Res. 60 2178-2189, 2000), o

B. Anticuerpo. Anti-VEGF; tanto el anticuerpo monoclonal neutralizante VEGF-A 4301-42-35 (Schlaeppli y otros, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 125, 336-342, 1999), o el anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que reconoce específicamente el complejo del receptor I VEGF-A/VEGF humano (WO9919361).

5 No hay ejemplificación del resto del amplio alcance de la solicitud. Particularmente, no hay ejemplificación que no sea el uso de sTie-2 para lograr la interferencia funcional con el sistema Angiopoyetina/receptor Tie. Por lo tanto no está claro para la persona con experiencia qué otras combinaciones, a partir de la gran gama de permutaciones posibles, sería terapéuticamente eficaz.

10 La presente invención se relaciona con una combinación de un antagonista de la actividad biológica de la Angiopoyetina-2 y un antagonista de la actividad biológica de VEGF-A, y/o KDR, y/o Flt1, y los usos de esas combinaciones.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona una combinación de un antagonista de anticuerpo de la actividad biológica de la Angiopoyetina-2, que inhibe la unión Ang-2/Tie-2, y un antagonista de la actividad biológica de:

- 15
- I. VEGF-A, y/o
  - II. KDR, y/o
  - III. Flt1,

20 en donde el antagonista del anticuerpo de la Angiopoyetina-2 es un anticuerpo que comprende:

- (a) una región VH que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6; y
- (b) una región VL que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8 y

25 En una modalidad el antagonista del anticuerpo de la Angiopoyetina-2 contiene sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden ser solamente fuera de las regiones CDR.

En una modalidad el antagonista del anticuerpo de la Angiopoyetina-2 es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

30 En una modalidad el antagonista del anticuerpo de la Angiopoyetina-2 se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende

- 35
- (a) una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6; y
  - (b) una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8.

En una modalidad el antagonista del anticuerpo de la Angiopoyetina-2 comprende:

- 40
- (a) una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6; y
  - (b) una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8.

En una modalidad, el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 es un anticuerpo, preferentemente DC101

45 En una modalidad, el antagonista de la actividad biológica de VEGF-A es un anticuerpo, preferentemente Avastina.

En una modalidad, el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 es un inhibidor de tirosina cinasa.

50 En una modalidad, el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 se selecciona de Zactima™, AZD2171, SU11248, SU14813, Vatalanib, BAY43-9006, XL-647, XL-999, AG-013736, AMG706, BIBF1120, TSU68, GW786034, AEE788, CP-547632, KRN 951, CHIR258, CEP-7055, OSI-930, ABT-869, E7080, ZK-304709, BAY57-9352, L-21649, BMS582664, XL-880, XL-184 o XL-820. Preferentemente el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 se selecciona de Zactima™, AZD2171, SU11248 o BAY 43-9006. Con la máxima preferencia, el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 es Zactima™ o AZD2171.

55 En otro aspecto se proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación como la descrita anteriormente.

En otro aspecto las combinaciones descritas anteriormente pueden usarse para antagonizar la actividad biológica de la Angiopoyetina-2 y uno cualquiera de;

- 5 I. VEGF-A, y/o  
 II. KDR, y/o  
 III. Flt1.

10 En otro aspecto se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación descrita anteriormente para usar en el tratamiento de la angiogénesis relacionada con la enfermedad en un mamífero.

En otro aspecto se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación descrita anteriormente para usar en el tratamiento de cáncer en un mamífero.

15 Los usos de la combinación como se describe en la presente descripción pueden ser logrados por medio de la administración simultánea, secuencial o por separado de los componentes individuales de dicho tratamiento. Un tratamiento de combinación como se describe en la presente descripción puede aplicarse como una terapia única o puede involucrar cirugía o radioterapia adicional o un agente quimioterapéutico adicional al tratamiento de combinación de la invención.

20 La dosificación de una formulación de combinación para un paciente dado se determinará por el médico que lo atiende tomando en consideración varios factores conocidos para modificar la acción de los fármacos que incluyen severidad y tipo de enfermedad, peso corporal, sexo, dieta, tiempo y vía de administración, otros medicamentos y otros factores clínicos relevantes. Las dosificaciones terapéuticamente eficaces pueden determinarse por métodos *in vitro* o *in vivo*.

25 Una cantidad eficaz de una combinación, descrita en la presente descripción, a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración, y la afección del paciente. En consecuencia, se prefiere que el médico titule la dosificación y modifique la vía de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica diaria puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.001mg/kg a 100mg/kg o más, en dependencia de los factores mencionados anteriormente. Típicamente, el médico administrará el anticuerpo terapéutico hasta que se alcance la dosis que logre el efecto deseado. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por ensayos convencionales o como se describe en la presente descripción.

30 La vía de administración del anticuerpo está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intratecal, inhalación o intralesional, o por sistemas de liberación sostenida como se destaca más abajo. El anticuerpo se administra preferentemente de manera continua por infusión o por inyección de bolo.

35 Una cantidad eficaz del anticuerpo a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y la afección del paciente. En consecuencia, se prefiere que el médico titule la dosificación y modifique la vía de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Típicamente, el médico administrará el anticuerpo hasta que se alcance la dosis que logre el efecto deseado. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por ensayos convencionales o por los ensayos descritos en la presente descripción.

40 Una combinación descrita en la presente puede estar en una forma adecuada para la administración oral, por ejemplo, como una tableta o cápsula, para la administración nasal o para la administración por inhalación, por ejemplo en forma de polvo o solución, para inyección parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea, intramuscular, intravascular o infusión), por ejemplo, como una solución estéril, suspensión o emulsión, para administración tópica, por ejemplo, como una pomada o crema, para administración rectal, por ejemplo, como un supositorio o la ruta de administración puede ser por inyección directa en el tumor o por aplicación regional o por aplicación local. En otras modalidades de la presente invención un tratamiento de combinación puede ser aplicado por endoscopia, por vía intratraqueal, por vía intralesional, por vía percutánea, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal o por vía intratumoral. Preferentemente una combinación de la invención se administra por vía oral. En general las combinaciones descritas en la presente se pueden preparar en una manera convencional usando excipientes convencionales. Una combinación de la presente invención se presenta ventajosamente en forma de dosificación unitaria.

55 Los anticuerpos descritos en la presente pueden prepararse en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición terapéutica puede administrarse intravenosamente o a través de la nariz o pulmón, preferentemente como un aerosol líquido o en polvo (liofilizado). La composición puede administrarse además de forma parenteral o subcutánea

como se desee. Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica debe estar estéril, libre de pirógeno y en una solución parenteralmente aceptable que tiene debidamente en cuenta el pH, isotonicidad, y estabilidad. Estas condiciones se conocen por aquellos con experiencia en la materia. En resumen, las formulaciones de dosificación de los compuestos descritos en la presente descripción se preparan para almacenamiento o administración mediante la mezcla del compuesto que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes, o estabilizantes fisiológicamente aceptables. Dichos materiales son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como TRIS HCl, fosfato, citrato, acetato y otras sales de ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (menos que aproximadamente diez residuos) tales como poliarginina, proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol.

Las modalidades de la invención incluyen formulaciones farmacéuticas estériles de anticuerpos que son útiles como tratamientos para las enfermedades. Dichas formulaciones inhiben la actividad biológica del antígeno, y tratan así efectivamente las condiciones de la enfermedad donde, por ejemplo, el antígeno del suero o del tejido está anormalmente elevado. Los anticuerpos preferentemente poseen afinidad adecuada para neutralizar potentemente el antígeno, y preferentemente tienen una duración de acción adecuada para permitir una dosificación no frecuente en humanos. Una duración de acción prolongada permitirá programas de dosificación menos frecuentes y más convenientes por vías parenterales alternativas tales como inyección subcutánea o intramuscular.

Las formulaciones estériles pueden crearse, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o después de la liofilización y reconstitución del anticuerpo. El anticuerpo ordinariamente se almacenará en forma liofilizada o en solución. Las composiciones de anticuerpos terapéuticos generalmente se colocan en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un adaptador que permite la recuperación de la formulación, tal como un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones estériles para inyección pueden formularse de acuerdo con la práctica convencional farmacéutica como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ma ed, Lippincott Williams & Wilkens Publishers (2003)). Por ejemplo, puede ser deseada una disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo tal como agua o aceites vegetales de origen natural como ajonjolí, cacahuate, o aceite de semilla de algodón o un vehículo sintético graso como oleato de etilo o similares. Los tampones, conservantes, antioxidantes y similares pueden incorporarse de acuerdo con la práctica farmacéutica aceptada.

Las combinaciones de la invención pueden suministrarse como formulaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilo-metacrilato) según lo descrito por Langer y otros, J. Biomed Mater. Res., (1981) 15:167-277 y Langer, Chem. Tech., (1982) 12:98-105, o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (la patente de Estados Unidos núm. 3,773,919, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman y otros, Biopolymers, (1983) 22:547-556), acetato de etileno-vinilo no degradable (Langer y otros, *supra*), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988).

Aunque los polímeros tales como el acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas por más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo por un período largo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que resulta en una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Estrategias racionales se pueden elaborar para la estabilización de proteínas en dependencia de los mecanismos implicados. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de los residuos sulfhidrilos, la liofilización a partir de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, el uso de aditivos adecuados, y el desarrollo composiciones de matriz polimérica específicas.

Las composiciones de liberación sostenida además incluyen preparaciones de cristales del anticuerpo en suspensión en las formulaciones adecuadas capaces de mantener cristales en suspensión. Estas preparaciones cuando se inyectan por vía

5 subcutánea o por vía intraperitoneal pueden producir un efecto de liberación sostenida. Otras composiciones además incluyen anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen tales anticuerpos se preparan por métodos conocidos per se: patente de Estados Unidos núm. DE 3,218,121; Epstein y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, (1985) 82:3688-3692; Hwang y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, (1980) 77:4030-4034; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; 142,641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes de Estados Unidos núms. 4,485,045 y 4,544,545; y EP 102,324.

10 Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas de acuerdo con las composiciones y métodos en la presente descripción se administrarán con portadores, excipientes, y otros agentes adecuados que se incorporan en las formulaciones para proporcionar transferencia mejorada, despacho, tolerancia, y similares. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas (tales como Lipofectin™) que contienen lípido (catiónico o aniónico), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de carbocera (polietilenglicoles de varios pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen carbocera. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser adecuada en los tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que el ingrediente activo en la formulación no esté inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Ver además Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci .89(8):967-78 (2000), Powell y otros "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las citas en la misma para información adicional relacionada con las formulaciones, excipientes y portadores bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

15 La fabricación de anticuerpos monoclonales de especificidad predefinida por medio de líneas de células de un cultivo de tejido permanente se describió primero en 1975 (Kohler, G., & Milstein, C., Nature 256, 495-497, 1975). La fusión de un mieloma de ratón y células de bazo de ratón de un donante inmunizado crearon una línea celular que secretaba anticuerpos anti-glóbulos rojos (SRBC) de ovejas. Los acontecimientos posteriores significan que ahora es posible derivar anticuerpos humanos por métodos in vitro. Los ejemplos adecuados incluyen pero sin limitarse a la exposición en fago (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (antes Proliferon), Affimed) exposición en ribosoma (CAT), exposición en levadura, y similares.

20 Los anticuerpos, como se describe en la presente descripción, se prepararon a través de la utilización de la tecnología de Xenomouse®, como se describe más abajo. Después, estos ratones son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos y son deficientes en la producción de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos murinos. Las tecnologías utilizadas para conseguir los mismos se describen en las patentes, solicitudes, y referencias descritas en la presente descripción. En particular, sin embargo, una modalidad preferida de producción de ratones y anticuerpos transgénicos de ahí se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos con núm. de serie 08/759,620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las solicitudes de patente internacionales núms. WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000. Se incorpora además Mendez y otros Nature Genetics 15:146-156 (1997).

25 A través del uso de esta tecnología se han producido anticuerpos monoclonales completamente humanos contra una variedad de antígenos. Prácticamente, las líneas de ratones Xenomouse® se inmunizan con un antígeno de interés, las células linfáticas (tales como las células B) se recuperan del ratón hiperinmunizado, y los linfocitos recuperados se funden con una con una línea celular de tipo mielóide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortal. Estas líneas celulares de hibridoma se tamizan y se seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En la presente descripción se proporcionan métodos para la producción de múltiples líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos. Más aun, en la presente descripción se proporciona la caracterización de los anticuerpos producidos por tales líneas celulares, que incluyen el análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de tales anticuerpos.

30 Alternativamente, en lugar de fundirlas con células de mieloma para generar hibridomas, las células B se pueden ensayar directamente. Por ejemplo, las células B CD19+ se pueden aislar a partir de ratones Xenomouse® hiperinmunes y se dejan proliferar y diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Los anticuerpos del sobrenadante de las células se examinan después por ELISA para la reactividad contra el inmunógeno. Los sobrenadantes se pueden examinar además para la inmunoreactividad contra fragmentos del inmunógeno para adicionalmente mapear los diferentes anticuerpos para la unión a dominios de interés funcional en el inmunógeno. Los anticuerpos se pueden examinar también contra otras proteínas humanas relacionadas y contra la rata, el ratón, y los primates no-humanos, tales como el mono cynomolgus,

ortólogos del inmunógeno, para determinar la reactividad cruzada de especies. Las células B de pocillos que contenían los anticuerpos interés se pueden immortalizar por varios métodos que incluyen la fusión para hacer hibridomas ya sea de pocillos individuales o agrupados, o por infección con el virus Epstein Barr o la transfección mediante genes immortalizados conocidos y después sembrados en un medio adecuado. Alternativamente, las células plasmáticas individuales que secretan anticuerpos con las especificidades deseadas se aíslan después usando los ensayos de placa hemolítica específico de antígenos (ver por ejemplo Babcook y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48 (1996)). Las células destinadas para la lisis son preferentemente glóbulos rojos de oveja (SRBC) recubiertos con el antígeno.

En presencia de un cultivo de células B que contiene células plasmáticas secretoras de la inmunoglobulina de interés y complemento, la formación de una placa indica la lisis mediada por el antígeno específico de los glóbulos rojos de oveja que rodean la célula plasmática de interés. La célula plasmática individual específica del antígeno en el centro de la placa se puede aislar y la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo se aísla de la célula plasmática individual. Usando la transcripción inversa seguido por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), el ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo se puede clonar. Dicho ADN clonado se puede insertar después adicionalmente en un vector de expresión adecuado, preferentemente un casete de vector tal como un pcADN, con mayor preferencia tal como un vector pcADN que contiene los dominios constantes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina. El vector generado se puede transfectar después en células hospederas, por ejemplo, las células HEK293, las células CHO, y cultivarse en medios de nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para inducir la transcripción, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Generalmente, los anticuerpos producidos por los hibridomas fundidos fueron cadenas pesadas de IgG2 humana con cadenas ligeras kappa o lambda completamente humanas. Los anticuerpos descritos en la presente descripción poseen cadenas pesadas IgG4 así como cadenas pesadas IgG2 humanas. Los anticuerpos pueden ser además de otros isotipos humanos, se incluye IgG1. Los anticuerpos poseen altas afinidades, típicamente poseen una Kd de aproximadamente  $10^{-6}$  a aproximadamente  $10^{-12}$  M o por debajo, cuando se mide por técnicas en fase sólida y en fase de solución.

La generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, a través de la fusión microcelular, se han introducido grandes piezas de cromosomas, o cromosomas enteros, se describen en las solicitudes de patentes europeas núms. 773 288 y 843 961. Además, se generaron los ratones KM<sup>TM</sup>, que son el resultado del cruzamiento de ratones Tc de Kirin con ratones con minilocus de Medarex (Humab). Estos ratones poseen el transcromosoma de IgH humana de los ratones Kirin y el transgen de la cadena kappa de los ratones Genpharm (Ishida y otros, Cloning Stem Cells, (2002) 4:91-102).

Como se apreciará, los anticuerpos se pueden expresar en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican los anticuerpos particulares se pueden usar para transformar una célula hospedera de mamífero adecuada. La transformación puede ser por cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, que incluye, por ejemplo empaque del polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector) o por procedimientos de transfección conocidos en la materia, como se ejemplifica por las patentes de Estados Unidos núms. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, y 4,959,455. El procedimiento de transformación usado depende del huésped a transformar. Los métodos para introducir los polinucleótidos heterólogos en las células de mamífero se conocen bien en la materia e incluyen la transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en la materia e incluyen muchas líneas celulares immortalizadas disponibles a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que incluyen, pero sin limitarse a células de ovario de hámster Chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células 293 de riñón epiteliales humanas, y un número de otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan a través de la determinación de qué líneas celulares tienen niveles más altos de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión al antígeno constitutivas.

A menos que se defina de cualquier otra forma, los términos científicos y técnicos usados en la presente descripción tendrán el significado que se entienden comúnmente por aquellos con experiencia ordinaria en la materia. Además, a menos que el contexto los requiera de cualquier otra forma, los términos singulares incluirán los plurales y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y técnicas de, cultivo de tejidos y células, biología molecular, y la química e hibridación de proteínas y oligo- o polinucleótidos descritas en la presente descripción son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la materia.

Las técnicas estándar se usan para el ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo de tejido y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como comúnmente se realizan en la materia o como se describen en la presente descripción. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la materia y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente especificación. *Ver por ejemplo*, Sambrook y otros *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ra ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)), la cual se incorpora en la presente como referencia. Las nomenclaturas usadas respecto a, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente descripción son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la materia. Las técnicas estándar se usan para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y tratamiento de los pacientes.

Los siguientes términos, a menos que se indique de cualquier otra forma, se entenderán que tienen los siguientes significados:

Un antagonista puede ser un polipéptido, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, compuesto de peso molecular pequeño, un oligonucleótido, un oligopéptido, ARN interferente (iARN), antisentido, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de estos. Para una revisión del iARN ver Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. (*Pharmacol Rev.* 2003 dic.;55(4):629-48. Revisado.) y antisentido ver Opalinska JB, Gewirtz AM. (*Sci STKE.* 28 de oct. 2003; 2003(206):pe47.)

Un antagonista de la Angiopoyetina-2 puede ser cualquier antagonista de la actividad biológica de la Angiopoyetina-2, que incluye antagonistas que antagonizan la actividad biológica de la Angiopoyetina-2 y otras Angiopoyetinas que incluyen la Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-3 y/o Angiopoyetina-4. Un antagonista de la Angiopoyetina-2 puede unirse al ligando solo, o al ligando cuando el ligando está unido a su receptor.

Un antagonista del VEGF-A puede ser cualquier antagonista de la actividad biológica del VEGF-A, en donde el antagonista puede unirse al ligando solo, o al ligando cuando el ligando está unido a su receptor. El antagonista puede prevenir la transducción de señales de Flt1 o KDR mediada por VEGF-A, inhibiendo de ese modo la angiogénesis. El mecanismo de acción de esta inhibición puede incluir la unión del antagonista a VEGF-A y la inhibición de la unión de VEGF-A a su receptor, ya sea Flt1 o KDR. Alternativamente el antagonista se puede unir a VEGF-A cuando VEGF-A se asocia con un receptor, ya sea Flt1 o KDR, y de ese modo prevenir la transducción de señales de Flt1 o KDR mediada por VEGF-A. Alternativamente el antagonista puede mejorar el aclaramiento del VEGF-A en el mismo al disminuir la concentración eficaz de VEGF-A para la unión a Flt1 o KDR.

Una composición es preferentemente una composición farmacéutica que comprende uno o más antagonistas. Los antagonistas de la composición pueden administrarse separadamente, secuencialmente o concurrentemente.

La angiogénesis relacionada con la enfermedad puede ser cualquier angiogénesis anormal, indeseable o patológico, por ejemplo, la angiogénesis relacionada con el tumor. La angiogénesis relacionada con la enfermedad incluye, pero sin limitarse a, tumores no sólidos tales como leucemia, mieloma múltiple, malignidades hematológicas o linfoma, y además tumores sólidos y sus metástasis tales como melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), glioblastoma, carcinoma de tiroides, del conducto biliar, huesos, gástrica, cerebro/CNS, cabeza y cuello, hepático, estómago, próstata, mamas, renal, testicular, ovarios, piel, cervical, pulmón, músculos, neuronal, esofágica, vejiga, pulmón, uterino, vulval, endometrial, riñón, colorrectal, pancreático, membranas pleural/peritoneal, glándula salivar, y tumores epidermoides.

El crecimiento vascular excesivo contribuye además a numerosos trastornos no neoplásicos. Estas enfermedades relacionadas con la angiogénesis no neoplásica incluyen: aterosclerosis, hemangioma, hemangioendotelioma, angiofibroma, malformaciones vasculares (por ejemplo, Teleangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT), o síndrome de Osler-Weber), verrugas, granulomas pirogénicos, crecimiento excesivo del vello, sarcoma de Kaposi, queloides con cicatrices, edema alérgico, soriasis, sangramiento uterino disfuncional, quistes foliculares, hiperestimulación del ovario, endometriosis, diestrés respiratorio, ascitis, esclerosis peritoneal en pacientes con diálisis, formación de adhesión resultado de la cirugía abdominal, obesidad, artritis reumatoide, sinovitis, osteomielitis, crecimiento del pannus, osteofito, articulaciones hemofílicas, procesos inflamatorios e infecciosos (por ejemplo hepatitis, neumonía, glomerulonefritis), asma, pólipos nasales, regeneración del hígado, hipertensión pulmonar, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, degeneración

macular relacionada con la edad, leucomalacia, glaucoma neovascular, neovascularización del injerto corneal, tracoma, tiroiditis, agrandamiento de las tiroides, y trastornos linfoproliferativos.

5 Un compuesto se refiere a cualquier compuesto de poco peso molecular con un peso molecular de menos que 2000 Daltons.

10 El término 'anticuerpo' se refiere a un polipéptido o un grupo de polipéptidos que comprenden al menos un dominio de unión que se forma a partir del plegamiento de las cadenas de polipéptidos que tienen espacios de unión tridimensionales con la superficie interna de las formas y distribuciones de carga complementarias con las características de un determinante antigénico de un antígeno. Un anticuerpo tiene típicamente una forma tetramérica, que comprende dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" y una "pesada". Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman un sitio de unión al anticuerpo. Un anticuerpo puede ser oligoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo multi-específico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo catalítico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo anti-idiotipo y los anticuerpos que se pueden marcar en forma soluble o enlazada, así como fragmentos, variantes o derivados de éstos, ya sea solos o en conjunto con otras secuencias de aminoácidos que se proporcionan por las técnicas conocidas. Un anticuerpo podría ser de cualquier especie. El término anticuerpo también incluye fragmentos de unión de los anticuerpos de la invención; los fragmentos ilustrativo incluyen Fv, Fab, Fab', anticuerpo de cadena sencilla (svFC), región variable dimérica (diacuerpo) y región variable estabilizada con disulfuro (dsFv).

20 El término "neutralizante" cuando se refiere a un anticuerpo se relaciona con la capacidad de un anticuerpo para eliminar, o reducir significativamente, la actividad de un antígeno objetivo. En consecuencia, un anticuerpo de anti-Angiopoyetina-2 "neutralizante" es capaz de eliminar o reducir significativamente la actividad de la Angiopoyetina-2. Un anticuerpo de anti-Angiopoyetina-2 neutralizante puede actuar, por ejemplo, bloqueando la unión de la Angiopoyetina-2 a su receptor Tie-2. Al bloquear esta unión, la transducción de señales mediada por Tie-2 se elimina significativamente o completamente. Lo ideal sería que un anticuerpo neutralizante contra la Angiopoyetina-2 inhiba la angiogénesis.

30 El término "polipéptido" se usa en la presente descripción como un término genérico para referirse a la proteína nativa, fragmentos, o análogos de una secuencia de polipéptido. Por lo tanto, proteína nativa, fragmentos, y análogos son especies del género polipéptido. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención comprenden la cadena pesada de las moléculas de inmunoglobulina humana y la cadena ligera kappa de las moléculas de inmunoglobulina humana, así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden la cadena pesada de las moléculas de inmunoglobulina con la cadena ligera de las moléculas de inmunoglobulina, tales como la cadena ligera de las moléculas de inmunoglobulina kappa o lambda, y viceversa, así como fragmentos y análogos de los mismos. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención pueden comprender además únicamente la cadena pesada de las moléculas de inmunoglobulinas humanas o fragmentos de las mismas.

40 El término "de origen natural" como se usa en la presente descripción tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, la secuencia de un polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (se incluyen virus) que se pueden aislar a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otra manera es de origen natural.

45 El término "polinucleótido" como se refiere en la presente descripción significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases en longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, o el hetero-dúplex ARN-ADN. El término incluye formas de ADN de cadena doble y sencilla.

50 El término "oligonucleótido" referido en la presente descripción incluye los nucleótidos de origen natural, y modificados unidos entre sí mediante vínculos de origen natural, y de origen no natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprenden generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferentemente, los oligonucleótidos son de 10 a 60 bases de longitud y con la máxima preferencia 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son generalmente de cadena sencilla, por ejemplo para sondas; aunque los oligonucleótidos pueden ser doble cadena, por ejemplo para usar en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

55 Dos secuencias de aminoácidos son "homólogas" si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, 85% de homología significa que 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias están alineadas para la máxima coincidencia. Las interrupciones (en cualquiera de las dos secuencias que se hacen coincidir) se permiten en la maximización de coincidencia; se prefiere la longitud de la interrupción de 5 o menos, con mayor preferencia de 2 o

menos. Alternativamente y preferentemente, dos secuencias de proteína (o secuencias de polipéptido derivadas de ellas de al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, tal como este término se usa en la presente descripción, si tienen una puntuación de alineamiento de más de 5 (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización de interrupción de 6 o mayor. Ver Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Suplemento 2 de este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de ellas son con mayor preferencia homólogas si sus aminoácidos son mayores que o igual a 50% idénticos cuando se alinean óptimamente con el programa ALIGN. Se debe apreciar que pueden haber regiones de homología diferente dentro de dos secuencias ortólogas. Por ejemplo, los sitios funcionales de los ortólogos de ratón y humano pueden tener un grado superior de homología que las regiones no funcionales.

Como se usa en la presente descripción, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver Immunology - A Synthesis (2da Edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, los D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales tales como  $\alpha$ -aminoácidos,  $\alpha$ -aminoácidos, disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales podrían ser también componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de los aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi-prolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetilisina,  $\epsilon$ -N-acetilisina, O-fosfo-serina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilisina,  $\sigma$ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi-prolina). En la anotación de polipéptido que se usa en este documento, la dirección a la izquierda es la dirección del amino terminal y la dirección a la derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con el uso y convención estándar.

Del mismo modo, a menos que se especifique lo contrario, el extremo de la izquierda de secuencias de polinucleótidos de cadena sencilla es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de secuencias de polinucleótidos de doble cadena se conoce como dirección 5'. La dirección de adición 5' a 3' de transcritos de ARN naciescentes se refiere a la dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se refieren como "secuencias corriente arriba"; las regiones de secuencias en la cadena de ADN que tienen las mismas secuencias que el ARN y que son 3' al extremo 3' del transcrito de ARN se refieren como "secuencias corriente abajo".

Como se discute en la presente descripción, pequeñas variaciones en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulinas se contemplan como que la presente invención las abarca, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 95%, y con la máxima preferencia 99% de identidad de secuencia con los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulinas descritas en la presente descripción. Particularmente, se contemplan las sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que tienen cadenas laterales relacionadas. Los aminoácidos genéticamente codificados se dividen generalmente en familias: (1) ácido =aspartato, glutamato; (2) básico=lisina, arginina, histidina; (3) no polar=alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar no cargado=glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Las familias más preferidas son: la serina y treonina son una familia alifática-hidroxi; la asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; la alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y la fenilalanina, triptófano, y tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante en la función de unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido dentro de un sitio de marco. Si un cambio de amino ácido resulta en un péptido funcional se puede determinar fácilmente mediante el ensayo de la actividad específica del polipéptido derivado. En la presente descripción se describen los ensayos en detalle. Aquellos con experiencia ordinaria en la materia pueden preparar fácilmente los fragmentos o los análogos de los anticuerpos o las moléculas de inmunoglobulinas. Los amino- y carboxi-terminal preferidos de los fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse por comparación de los datos de las secuencias de nucleótido y/o aminoácido con las bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferentemente, se usan métodos de comparación computarizados para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de la proteína predicha que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar las secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie y otros Science 253:164 (1991). Así, los ejemplos anteriores demuestran que aquellos con experiencia en la materia pueden reconocer los motivos de secuencias y las conformaciones estructurales que se pueden usar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con los anticuerpos descritos en la presente descripción.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la

susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas mutéínas de una secuencia distinta de la secuencia del péptido de origen natural. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferentemente sustituciones de aminoácidos conservadoras) en las secuencias de origen natural (preferentemente en la porción del polipéptido fuera del dominio(s) que forma los contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácido conservadora no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia de los parentales). Los ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la materia se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton y otros *Nature* 354:105 (1991).

El término "fragmento de polipéptido" como se usa en la presente descripción se refiere a un polipéptido que tiene una deleción amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la deducida secuencia de origen natural, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos típicamente son al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos 14 aminoácidos de longitud, con mayor preferencia al menos 20 aminoácidos de longitud, habitualmente al menos 50 aminoácidos de longitud, y aún con mayor preferencia al menos 70 aminoácidos de longitud. El término "análogo" como se usa en la presente descripción se refiere a polipéptidos que comprenden un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) la unión específica a una Angiopoyetina-2, bajo condiciones de unión adecuadas, (2) capacidad para bloquear la unión apropiada de la Angiopoyetina-2, o (3) capacidad para inhibir la actividad de la Angiopoyetina-2. Típicamente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución de aminoácido conservadora (o adición o deleción) con respecto a la secuencia de origen natural. Los análogos típicamente son de al menos 20 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos 50 aminoácidos de longitud o más largo, y frecuentemente pueden ser tan largos como un polipéptido de origen natural de longitud completa.

Los análogos peptídicos se usan en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber y Freidinger *TINS* p.392 (1985); y Evans y otros *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Tales compuestos frecuentemente se desarrollan con la ayuda del modelado molecular computarizado. Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles se pueden usar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como anticuerpo humano, pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste de: --CH<sub>2</sub>NH--, --CH<sub>2</sub>S--, --CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>--,-CH=CH--(cis y trans), --COCH<sub>2</sub>--,-CH(OH)CH<sub>2</sub>--, y -CH<sub>2</sub>SO--, por método bien conocidos en la materia. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Adicionalmente se pueden generar péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de la secuencia consenso sustancialmente idéntica por métodos conocidos en la materia (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)); por ejemplo, por la adición de residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Los "fragmentos de unión" de un anticuerpo se producen por técnicas de ADN recombinante, o por escisión química o enzimática de los anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, y anticuerpos de cadena sencilla. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un receptor a un contra-receptor cuando un exceso de anticuerpos reduce la cantidad de receptor unido al contra-receptor en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60% o 80%, y más generalmente mayor que aproximadamente 85% (según se midió en un ensayo competitivo *in vitro*).

El término "epítopo" incluye cualquier proteína determinante capaz de la unión específica a una Inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos por lo general consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y podrían, pero no siempre, tener características específicas de estructura tridimensional, así como las características específicas de carga. Se dice que un anticuerpo se une de manera específica a un epítopo cuando la constante de disociación es  $\leq 1 \mu\text{M}$ , preferentemente  $\leq 100 \text{ nM}$  y con la máxima preferencia  $\leq 10 \text{ nM}$ .

El término "agente" se usa en la presente descripción para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos.

5 "Activo" o "actividad" en lo que se refiere a un polipéptido Angiopoyetina-1 o uno Angiopoyetina-2 se refiere a una porción del polipéptido que tiene una actividad biológica o una actividad inmunológica de acuerdo con el polipéptido nativo. "Biológica" cuando se usa en la presente descripción se refiere a una función biológica que resulta de la actividad del polipéptido nativo. Por ejemplo, una actividad biológica de la Angiopoyetina-2 preferida incluye la angiogénesis inducida por la Angiopoyetina-2.

10 "Mamífero" se refiere a todos los mamíferos, pero preferentemente el mamífero es humano.

15 La digestión de los anticuerpos con la enzima papaína resulta en dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, además se conocen como fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc", que no tiene actividad de unión al antígeno pero que tiene la capacidad de cristalizar. La digestión de los anticuerpos con la enzima pepsina resulta en un fragmento F(ab')<sub>2</sub> en el que los dos brazos de la molécula de anticuerpo permanecen unidos y comprende dos sitios de unión al antígeno. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> tiene la capacidad de entrecruzar el antígeno.

20 "Fv" cuando se usa en la presente descripción se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que conserva tanto el reconocimiento del antígeno y los sitios de unión al antígeno.

"Fab" cuando se usa en la presente descripción se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

25 El término "mAb" se refiere al anticuerpo monoclonal.

"Liposoma" cuando se usa en la presente descripción se refiere a una vesícula pequeña que puede ser útil para la administración de fármacos que pueden incluir el polipéptido Angiopoyetina-2 de la invención o anticuerpos a este polipéptido Angiopoyetina-2 a un mamífero.

30 "Etiqueta" o "etiquetada" como se usa en la presente se refiere a la adición de una porción detectable a un polipéptido, por ejemplo, una etiqueta radiactiva, etiqueta fluorescente, etiqueta enzimática etiqueta quimioluminiscente o un grupo biotínico. Los radioisótopos o radionúclidos pueden incluir <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, las etiquetas fluorescentes pueden incluir rodamina, fósforos lantánidos, o FITC y las etiquetas enzimáticas pueden incluir peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina.

35 El término "agente farmacéutico o fármaco" como se usa en la presente se refiere a un compuesto químico, combinación o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente. Otros términos químicos en la presente descripción se usan de acuerdo con el uso convencional en la materia, como se ejemplifica por The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

40 El término paciente incluye a sujetos humanos o veterinarios.

45 La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes, que se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no han de interpretarse como una limitación en las enseñanzas en la presente descripción, en el que:

Figura 1a. Muestra la eficacia de combinación después del tratamiento con mAb 3.19.3 y VTKI (inhibidor de tirosina cinasa VEGF (-4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina)) en ratones que portan tumores de xenoinjerto A431.

50 Figura 1b. Muestra los efectos en los cambios del peso corporal del huésped después del tratamiento de combinación con mAb 3.19.3 y VTKI (inhibidor de tirosina cinasa VEGF (-4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina)) en ratones que portan tumores de xenoinjerto A431.

Figura 2a. Muestra la eficacia de combinación después del tratamiento con mAb 3.19.3 y VTKI (inhibidor de tirosina cinasa VEGF (-4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina)) en ratones que portan tumores de xenoinjerto Colo205.

55 Figura 2b. Muestra los efectos en los cambios del peso corporal del huésped después del tratamiento de combinación con mAb 3.19.3 y VTKI (inhibidor de tirosina cinasa VEGF (-4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina)) en ratones que portan tumores de xenoinjerto Colo205.

Figura 3a. Muestra la eficacia de la combinación después del tratamiento con mAb 3.19.3 y AZD2171 en ratones que portan tumores de xenoinjerto HT29.

Figura 3b . Muestra los efectos sobre los cambios de peso corporal del huésped después del tratamiento combinado con mAb 3.19.3 y AZD2171 en ratones que portan tumores de xenoinjerto HT29.

Figura 4a. Muestra la eficacia de la combinación después del tratamiento con mAb 3.19.3 y Zactima™ en ratones que portan tumores de xenoinjerto LoVo.

Figura 4b. Muestra los efectos sobre los cambios de peso corporal del huésped después del tratamiento combinado con mAb 3.19.3 y Zactima™ en ratones que portan tumores de xenoinjerto LoVo.

Figura 5a. Muestra la eficacia de la combinación después del tratamiento con mAb 3.19.3 y mAb DC101 en ratones que portan tumores de xenoinjerto de colon SW620.

Figura 5b. Muestra los efectos sobre los cambios de peso corporal del huésped después del tratamiento combinado con mAb 3.19.3 y mAb DC101 en ratones que portan tumores de xenoinjerto de colon SW620.

## EJEMPLO 1: GENERACIÓN DEL ANTICUERPO

### Inmunización

Angiopoyetina-2 humana recombinante obtenida de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN Cat. núm. 623-AM/CF) se usó como un antígeno. Los anticuerpos monoclonales contra la Angiopoyetina-2 se desarrollaron por inmunización secuencial de ratones Xenomouse® (las cepas de Xenomouse XMG2 y XMG4 (cepa 3C-1), Abgenix, Inc. Fremont, CA). Los animales Xenomouse se inmunizaron por la vía de la almohadilla de la pata para todas las inyecciones. El volumen total de cada inyección fue 50 µl por ratón, 25 µl por almohadilla de la pata. La primera inyección fue con 2.35 µg de Angiopoyetina-2 (rhAngiopoyetina-2, cat#623-AM/CF; lote #BN023202A) humana recombinante en PBS de Dulbecco (DPBS) libre de pirógeno y se mezcló 1:1 v/v con 10 µg de CpG (15 µl de ImmunEasy Mouse Adjuvant, catálogo # 303101; lote #11553042; Qiagen) por ratón. Los siguientes 6 estímulos fueron con 2.35 µg de rhANGIOPOYETINA-2 en DPBS libre de pirógeno, se mezcló con 25 µg de Adju-Phos (gel de fosfato de aluminio, Catálogo # 1452-250, lote #8937, HCl Biosector) y 10 µg de CpG por ratón, seguido por un estímulo final de 2.35 µg de rhAngiopoyetina-2 en DPBS libre de pirógeno, sin adyuvante. Los ratones Xenomouse se inmunizaron en los días 0, 3, 6, 10, 13, 17, 20, y 24 de este protocolo y las fusiones se realizaron en el día 29.

### Selección de animales para la cosecha por título

Los títulos de anticuerpos anti-Angiopoyetina-2 en el suero de los ratones Xenomouse inmunizados se determinaron por ELISA. En resumen, placas de 96-pocillos de poliestireno Costar Labcoat Universal Binding (Coming, Acton, MA) se recubrieron con Angiopoyetina-2 recombinante (1 µg/ml) durante la noche a cuatro grados en tampón de recubrimiento de antígeno (tampón de carbonato 0.1 M, pH 9.6 NaHCO<sub>3</sub> 8.4 g/l). El día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (0.05% de Tween 20 en 1x PBS) usando un lavador de placas Biotek. Las placas después se bloquearon con 200 µl/pocillo de amortiguador de bloqueo (0.5% de BSA, 0.1% de Tween 20, 0.01% de Timerosal en 1x PBS) y se incubaron a temperatura ambiente por 1 h. Después del bloqueo de una hora, las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado usando un lavador de placas Biotek. El suero de cualquiera de los ratones Xenomouse inmunizados con Angiopoyetina-2 o los animales Xenomouse ingenuos se titularon en amortiguador PBS/0.5% de BSA a diluciones 1:3 por duplicado a partir de una dilución inicial 1:100. El último pocillo se dejó en blanco. Estas placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h, y las placas después se lavaron 3 veces con tampón de lavado usando un lavador de placas Biotek. Se añadió un anticuerpo específico anti-IgG Fc humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, Pierce, Rockford, IL) a una concentración final de 1 µg/ml y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado usando un lavador de placas Biotek.

Después del lavado, las placas se revelaron con la adición de sustrato cromogénico TMB (BioFxBSTP-0100-01) durante 10-20 min o hasta que los pocillos de control negativos empezaron a mostrar color. Después el ELISA se detuvo por la adición de solución de terminación (650 nM de reactivo de terminación para TMB (BioFxBSTP-0100-01), reconstituida con 100 ml H<sub>2</sub>O por botella). Se determinó el título específico de cada animal Xenomouse a partir de la densidad óptica a 650nm.

### Recuperación de linfocitos, aislamientos de células B, fusiones y generación de hibridomas

Los ratones inmunizados se sacrificaron por dislocación cervical, y los ganglios linfáticos de drenaje se recogieron y se agruparon a partir de cada cohorte. Las células linfoides se disociaron por trituración en DMEM para liberar las células de los tejidos y las células se suspendieron en DMEM. Las células se contaron, y 0.9 ml de DMEM por 100 millones de linfocitos se añadieron al sedimento de células para resuspender las células suavemente pero completamente. Usando 100

µl de perlas magnéticas CD90+ por 100 millones de células, las células se etiquetaron por incubación de las células con las perlas magnéticas a 4°C durante 15 minutos. La suspensión de células etiquetadas magnéticamente que contenía hasta  $10^8$  células positivas (o hasta  $2 \times 10^9$  células totales) se cargó en una columna LS+ y la columna se lavó con DMEM. El efluente total se recogió como la fracción negativa CD90 (la mayoría de estas células se esperaba que fueran células B).

La fusión se realizó por la mezcla de las células B lavadas, enriquecidas del paso anterior y las células P3X63Ag8.653 del mieloma no secretor adquiridas de la ATCC, cat.# CRL 1580 (Kearney y otros, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) a una relación de 1:1. La mezcla de células se sedimentó suavemente por centrifugación a 800 x g. Después de la eliminación completa del sobrenadante, las células se trataron con 2-4 ml de solución de pronasa (CalBiochem, cat. # 53702; 0.5 mg/ml en PBS) por no más de 2 minutos. Después se añadieron 3-5 ml de FBS para detener la actividad de la enzima y la suspensión se ajustó a 40 ml de volumen total usando la solución de electro fusión celular, (ECFS, 0.3M de sacarosa, Sigma, Cat# S7903, 0.1mM de acetato de magnesio, Sigma, Cat# M2545, 0.1mM de acetato de calcio, Sigma, Cat# C4705). El sobrenadante se eliminó después de la centrifugación y las células se resuspendieron en 40 ml de ECFS. Esta etapa de lavado se repitió y las células se resuspendieron de nuevo en ECFS a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml.

La electro fusión de células se realizó usando un generador de fusión (modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA). El tamaño de la cámara de fusión usada fue de 2.0 ml, usando los siguientes parámetros del instrumento:

Condición de alineación: voltaje: 50 V, tiempo: 50 seg.

Rompimiento de la membrana a: voltaje: 3000 V, tiempo: 30 µseg

Tiempo de retención post-fusión: 3 seg

Después de ECF, las suspensiones celulares se retiraron cuidadosamente de la cámara de fusión en condiciones estériles y se transfirieron a un tubo estéril que contenía el mismo volumen de medio de cultivo de hibridoma (DMEM, JRH Biosciences), 15 % de FBS (Hyclone), suplementado con L-glutamina, pen/strep, OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (todo de Sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim). Las células se incubaron durante 15-30 minutos a 37°C, y después se centrifugaron a 400 x g (1000 rpm) durante cinco minutos. Las células se resuspendieron suavemente en un pequeño volumen de medio de selección de hibridoma (medio de cultivo de hibridoma suplementado con 0.5x HA (Sigma, cat. # A9666)), y el volumen se ajustó adecuadamente con más medio de selección de hibridoma, en base a una siembra final de  $5 \times 10^6$  células B totales por placa de 96 pocillos y 200 µl por pocillo. Las células se mezclaron suavemente y se pipetearon en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer. En el día 7 o 10, la mitad del medio se eliminó y las células re-alimentaron con medio de selección de hibridoma.

#### Selección de anticuerpos candidatos por Elisa

Después de 14 días de cultivo, los sobrenadantes de los hibridomas se examinaron para anticuerpos monoclonales específicos de Angiopoyetina-2. Las placas de ELISA (Fisher, Cat. núm. 12-565-136) se recubrieron con 50 µl/pocillo de Angiopoyetina-2 (2 µg/ml) humana en tampón de recubrimiento (0.1 M de tampón carbonato, pH 9.6, NaHCO<sub>3</sub> 8.4 g/l), después se incubaron a 4°C durante la noche. Después de la incubación, las placas se lavaron con tampón de lavado (0.05% de Tween 20 en PBS) 3 veces. Se añadieron 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (0.5% de BSA, 0.1% de Tween 20, 0.01% de timerosal en 1x PBS) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavaron con tampón de lavado tres veces. Se añadieron 50 µl/pocillo del sobrenadante de los hibridomas, y los controles positivo y negativo se añadieron y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. El control positivo usado de principio a fin fue suero a partir del ratón Xenomouse inmunizado con Angiopoyetina-2, el grupo 1 Angiopoyetina-2 XMG2, almohadilla de la pata (fp) N160-7, y el control negativo fue suero a partir del ratón Xenomouse inmunizado con KLH, grupo 1 KLH XMG2, almohadilla de la pata (fp) L627-6.

Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl/pocillo del anticuerpo de detección anti-huIgGfC-HRP de cabra (Caltag, Cat. núm. H10507) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. En el tamiz secundario, los positivos en el primer tamizaje se seleccionaron en dos conjuntos, uno para la detección de hlgG y el otro para la detección de cadena ligera kappa Ig humana (anti-hlg kappa-HRP de cabra (Southern Biotechnology, Cat. núm.. 2060-05) con el fin de demostrar la composición completamente humana tanto para la IgG y la Ig kappa. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. 100 µl/pocillo de TMB (BioFX Lab. Cat. núm. TMSK-0100-01) se añadieron y las placas se dejaron desarrollar durante aproximadamente 10 minutos (hasta que los pocillos de control negativo apenas comenzaron a mostrar color). 50 µl/pocillo de solución de terminación (solución de terminación TMB, (BioFX Lab. Cat. núm. STPR-0100-01) después se añadieron y las placas se leyeron en un lector de placas de ELISA a 450nm. Había 185 anticuerpos kappa IgG completamente humanos contra Angiopoyetina-2.

5 Todos los anticuerpos que se unen en el ensayo ELISA se pueden contra-seleccionar por la unión a la Angiopoyetina-1 por ELISA con el fin de identificar aquellos que reaccionan de forma cruzada con la Angiopoyetina-1. Las placas de ELISA (Fisher, Cat. núm. 12-565-136) se recubrieron con 50 µl/pocillo de Angiopoyetina-1 recombinante (2 µg/ml, obtenida de R&D Systems, Cat. # 293-AN-025/CF) en tampón de recubrimiento (0.1 M de tampón de carbonato, pH 9.6, NaHCO<sub>3</sub> 8.4 g/l), después se incubaron a 4°C durante la noche.

Número de identificación del anticuerpo y número de identificación de secuencia

10 La Tabla 1 más abajo informa el número de identificación del anticuerpo anti-Angiopoyetina-2 con el número de identificación de secuencia de los correspondientes genes de cadena pesada y cadena ligera.

Tabla 1

mAb núm.:	ID	Secuencia	SEQ NO.:	ID
3.3.2		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	1	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	2	
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	3	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	4	
3.19.3		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	5	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	6	
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	7	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	8	
3.31.2		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	9	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	10	
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	11	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	12	
5.16.3		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	13	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	14	
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	15	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	16	
5.28.1		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	17	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	18	
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	19	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	20	
5.78.3		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	21	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	22	
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	23	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	24	
5.86.1		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	25	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	26	
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	27	

mAb núm.:	ID	Secuencia	SEQ NO.:	ID
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	28	
5.88.3		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada. Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	29	30
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	31	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	32	
5.101.1		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	33	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	34	
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	35	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	36	
5.103.1		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	37	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	38	
		Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	39	
		Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	40	

#### Inhibición de la unión de Angiopoyetina-2 a Tie-2

5 Como se discutió anteriormente, la Angiopoyetina-2 ejerce su efecto biológico mediante la unión al receptor Tie-2. Los anticuerpos monoclonales que inhibieron la unión Angiopoyetina-2/Tie-2 se identificaron por un ensayo de unión competitiva usando un ELISA modificado. Los mAb usados fueron productos de la micro-purificación a partir de 50 ml sobrenadantes exhaustivos de los grupos de hibridomas que eran específicos para Angiopoyetina-2 (ver anteriormente). Nunc Implates™ de 96-pocillos se recubrieron con 100 µl de la proteína de fusión Tie-2/Fc humana recombinante (R&D Systems, Inc., Cat. núm. 313-TI-100) a 4 µg/ml por la incubación durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron cuatro veces usando amortiguador fosfato salino (PBS) con una estación lavadora Skan™ 300 (SKATRON). Los pocillos se bloquearon con 100 µl del amortiguador de bloqueo ABX (0.5% de BSA, 0.1% de Tween, 0.01% de Timerosal en PBS) durante 1 hora

15 Angiopoyetina-2 humana recombinante biotinilada (R&D Systems, Inc. Cat. núm. BT623) a 100 ng/ml se añadió en cada pocillo con o sin el mAb anti Angiopoyetina-2 a 100 µg/ml. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas antes de que las moléculas no unidas se lavaran. La Angiopoyetina-2 biotinilada unida después se detectó usando 100 µl/pocillo del conjugado estreptavidina-HRP a 1:200 mediante la incubación a temperatura ambiente durante media hora. Después de lavar dos veces, la estreptavidina unida se detectó mediante el sustrato HRP (R&D Systems, Cat. Núm. DY998). Las placas se incubaron durante 30 minutos antes de que se añadiera solución de terminación 450 (100 µl/pocillo, BioFX, Cat# BSTP-0100-01) para detener la reacción. La absorbancia de luz a 450 nm se determinó mediante un lector Spectramax Plus.

20 La proteína de fusión Tie-2/Fc recombinante soluble en exceso molar de 10 veces a la Angiopoyetina-2 se usó como un control positivo. A esta concentración, Tie-2/Fc inhibió la unión de Angiopoyetina-2 a Tie-2 inmovilizada en 80%. Con esto como un criterio arbitrario, 74 de los 175 mAb que se unen a la Angiopoyetina-2 mostraron actividad inhibidora.

25 Cada hibridoma se clonó usando un método de dilución limitada según los procedimientos estándar. Tres clones hermanos se obtuvieron de cada hibridoma. Para cada clon, el sobrenadante se probó usando el ELISA de unión a la Angiopoyetina-2 humana y la contra unión a la Angiopoyetina-1, como se describió anteriormente, para asegurar que cada anticuerpo fuera específico sólo para la Angiopoyetina-2. Se determinaron las concentraciones de IgG en los sobrenadantes exhaustivos, y se seleccionó un clon con el mayor rendimiento entre los tres clones hermanos de cada hibridoma para la purificación de IgG. Se purificaron de 0.5 a 1 mg de IgG a partir de cada sobrenadante para la caracterización adicional.

30 Para cuantificar las actividades inhibitoras del mAb sobre la unión a Angiopoyetina-2 a Tie-2, el título se determinó para los mAb purificados a partir de los mejores candidatos usando un ensayo de unión competitiva. Cada concentración del mAb se probó por duplicado. La relación concentración-respuesta se encontró mediante ajuste de curvas usando el software de

gráficos Graphpad Prism™ (curva sigmoidea, no lineal). La inhibición máxima (eficacia) y la IC<sub>50</sub> (potencia) se calcularon por el software. Se seleccionaron diez anticuerpos monoclonales que exhibían tanto eficacia y potencia altas; la eficacia y la potencia de estos mAb se muestran en la Tabla 2.

5

Tabla 2. Eficacia y potencia del mAb anti-Angiopoyetina-1/Angiopoyetina-2

Clon	Eficacia*	EC50 (µg/ml)
3.31.2	0.3751	0.04169
5.16.3	0.3279	0.08532
5.86.1	0.3844	0.1331
5.88.3	0.4032	0.1557
3.3.2	0.3881	0.1684
5.103.1	0.2317	0.3643
5.101.1	0.3639	0.3762
3.19.3	0.3945	0.7976
5.28.1	0.3892	2.698
5.78.3	0.2621	5.969

\* La eficacia se expresa como la relación de Angiopoyetina-2 unida con el mAb (30 µg/ml) vs. sin mAb.

La reactividad cruzada del mAb 3.19.3 a Angiopoyetina-1 después se investigó mediante la medición de la afinidad del mAb a la Angiopoyetina-1.

10

Determinación de la afinidad de los anticuerpos anti-Angiopoyetina-1 usando el análisis con Biacore

La reactividad cruzada del anticuerpo a Angiopoyetina-1 se investigó adicionalmente por la medición de la afinidad de los mAb a Angiopoyetina-1. En lugar de inmovilizar la Angiopoyetina-1, como se describe en el ELISA basado en la contra unión, los mAb se inmovilizaron a los chips Biacore CM5, y la Angiopoyetina-1 en solución se inyectó para la determinación de la velocidad de asociación y disociación. Se probaron seis mAb; 3.3.2, 3.31.2, 5.16.3, 5.86.1, 5.88.3 y 3.19.3.

15

Tamiz de resolución media

La instrumentación de resonancia de plasmón superficial libre de etiqueta (SPR), o Biacore 2000, se usó para medir la afinidad del anticuerpo a la Angiopoyetina-1. Para este propósito, se preparó una superficie de anticuerpo α-humano de cabra de alta densidad sobre un chip Biacore CM5 usando un acoplamiento de amina rutinario. Para los experimentos de desarrollo, los mAb purificados (clones 3.3.2, 3.31.2, 5.16.3, 5.86.1, 5.88.3 y 3.19.3) se diluyeron a aproximadamente 2.5-3.5 µg/ml en el tampón de corrida HBS-P que contenía 100 µg/ml de BSA. El nivel de captura para cada mAb fue aproximadamente 150 RU. Un lavado de 5 minutos siguió a cada ciclo de captura para estabilizar los valores iniciales de mAb.

20

25

Una única muestra de Angiopoyetina-1 diluida a 87.4 nM en el tampón de corrida se inyectó durante un minuto sobre todas las superficies de captura. La Angiopoyetina-1 se encontró que se une al mAb 3.19.3. Este experimento se repitió mediante el aumento de los niveles de captura del mAb a más de 500-600 RU y la inyección de 380 nM de Angiopoyetina-1 por un minuto. Se encontró de nuevo que la Angiopoyetina-1 se une al mAb 3.19.3.

30

EJEMPLO 2: ESTUDIOS DE COMBINACIÓN

Se evaluó la actividad del mAb 3.19.3 en combinación con inhibidores de la tirosina cinasa de VEGF de molécula pequeña.

35

Determinación de la eficacia terapéutica del mAb 3.19.3 en conjunto con 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina en los modelos de xenoinjertos de A431 y Colo205

La actividad antitumoral del anticuerpo monoclonal 3.19.3 en conjunto con el VTKI 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina se evaluó en un modelo de xenoinjerto de carcinoma epidermoide de piel humana (Estudio A) y en un modelo de cáncer colorrectal (Estudio B) usando líneas celulares A431 y Colo205 respectivamente.

5 Las células A431 y Colo205 se cultivaron en frascos como de rutina hasta que las células alcanzaron la sub-confluencia. Se usaron ratones hembra inmunodeficientes de 6-8 semanas de edad (Ncr/nu/nu). Las células se recogieron y se suspendieron en Matrigel. Una suspensión de células que contenía de 1 a  $5 \times 10^6$  células se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de los ratones. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos, cada uno contenía 10-15 ratones. Cuando el volumen del tumor alcanzó  $200\text{mm}^3$ , los ratones se asignaron aleatoriamente en cada uno de los grupos y se iniciaron los tratamientos. El mAb 3.19.3 10mg/kg en solución salina se inyectó por vía intraperitoneal, dos veces por semana durante 2 semanas. El 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina se trató por vía oral diariamente a dosis en el intervalo de 1.5 a 6mg/kg en agua que contenía 1% de Tween80. Las dimensiones de cada tumor se midieron dos veces por semana. El volumen del tumor se calculó como: volumen = longitud x (ancho)<sup>2</sup> x 0.5 (cm<sup>3</sup>).

15 Estudio A: Determinación de la eficacia terapéutica del mAb 3.19.3 en conjunto con 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina en xenoinjertos de tumores humanos A431

Los resultados del estudio de eficacia de la combinación de xenoinjerto A431 se muestran en la Figura 1a, que ilustra que la combinación produce una actividad significativamente mayor que cualquier agente individual solo. El % de inhibición del crecimiento tumoral conseguido es el siguiente:

20 3.19.3 (10mg/kg 2xwk) = 46%; (p<0.01)  
4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina (3mg/kg/día) = 69%; (p<0.001)  
25 Combinación 3.19.3 + 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina = 89% inhibición (p<0.001 para combinación vs. un solo agente).

No se observó toxicidad adicional con las combinaciones en comparación con el tratamiento del agente individual solo como se determinó por los cambios en el peso corporal (Figura 1b). Estos resultados demuestran que el tratamiento combinado con el mAb 3.19.3 anti-Ang2 y el VTKI 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina conduce a mejoras en la eficacia sin toxicidad aditiva en modelos pre-clínicos y proporciona bases para una mayor investigación clínica de esta combinación.

35 Estudio B: Determinación de la eficacia terapéutica del mAb 3.19.3 en conjunto con 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina en xenoinjertos de tumores de colon Colo205 humanos

Los resultados del estudio de eficacia de la combinación de xenoinjerto Colo205 se muestran en la Figura 2a, que ilustra que la combinación produce una actividad significativamente mayor que cualquier agente individual solo. El % de inhibición conseguido es el siguiente:

40 3.19.3 (10mg/kg 2xwk) = 35%; (p<0.05)  
4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina (6mg/kg/día) = 57%; (p<0.01)  
Combinación 3.19.3 + 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina = 87% inhibición (p<0.001 para combinación vs. un solo agente).

45 No se observó toxicidad adicional con las combinaciones en comparación con el tratamiento del agente individual solo como se determinó por los cambios en el peso corporal (Figura 2b). Estos resultados demuestran que el tratamiento combinado con el mAb 3.19.3 anti-Ang2 y el VTKI 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-piperidinopropoxi)quinazolina conduce a mejoras en la eficacia sin toxicidad aditiva en modelos pre-clínicos y proporciona bases para una mayor investigación clínica de esta combinación.

50 Determinación de la eficacia terapéutica del mAb 3.19.3 en conjunto con AZD2171 en xenoinjertos del tumor de colon HT29 humano

55 La eficacia del mAb 3.19.3 en combinación con AZD2171 se evaluó en xenoinjertos HT29 humanos. En resumen,  $5 \times 10^6$  células tumorales HT29 en 0.1 ml de medio (RPMI)- 1640 Roswell Park Memorial Institute libre de suero se inyectaron por vía subcutánea en los flancos de 60 ratones atímicos (*genotipo nul/nu*). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 200 a  $400\text{mm}^3$  (9-10 días), los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos (8 por grupo) y el tratamiento comenzó (día 0).

5 El grupo de control (Grupo 1) recibió una administración diaria oral (p.o.) de vehículo solo durante 28 días consecutivos (días 0 - 27). El tratamiento del Grupo 2 consistió en una administración p.o. diaria de AZD2171 solo a 1.5mg/kg/administración durante 28 días consecutivos (días 0 - 27). El AZD2171 se preparó como una suspensión en 1% de polisorbato 80 (es decir un 1% (v/v) solución de polioxietileno (20) sorbitán mono-oleato en agua desionizada). El Grupo 3 recibió ocho inyecciones intraperitoneales (i.p) de mAb 3.19.3 a 10mg/kg/inyección, en el día 0, 3, 7, 10,14, 17, 21, y 24. El Grupo 4 recibió la administración diaria p.o de AZD2171 a 1.5mg/kg/administración durante 28 días consecutivos (días 0 - 27) ) combinado con ocho inyecciones i.p del mAb 3.19.3 a 10mg/kg/inyección, en el día 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24. El volumen de administración de AZD2171 fue 10.0 ml/kg (es decir 200 µl para un ratón de 20 g). El volumen de inyección de mAb 3.19.3 fue 10.0 ml/kg (es decir 200 µl para un ratón de 20 g).

Tabla 3. Programa de dosificación

Grupo	Tratamientos	Dosis combinada del fármaco base/kg/inj.) (mg)	Vía de adm.	Núm. tratamientos	Núm. tratamiento/día	Intervalo de días entre tratamiento (Días)
1	Vehículo de AZD2171	0.0	p.o para vehículo de AZD2171	28 p.o	1 p.o	1 para p.o
2	AZD2171	1.5	p.o para AZD2171	28 p.o	1 p.o	1 para p.o
3	3.19.3	10	i.p para 3.19.3	8 i.p	3 o 4 para i.p	3 o 4 para i.p
4	AZD2171 + 3.19.3	1.5 para AZD2171 10 para 3.19.3	p.o para AZD2171 i.p para 3.19.3	28 p.o 8 i.p	1 p.o.	1 para p.o 3 o 4 para i.p

15 Los volúmenes de los tumores (mm<sup>3</sup>) se evaluaron al menos dos veces por semana o por medición del calibrador de Vernier bilateral y, tomando la longitud del diámetro más largo a través del tumor y el ancho correspondiente perpendicular, calculado usando la fórmula  $(\pi/6) \times (\text{longitud} \times \text{ancho}) \times \sqrt{(\text{longitud} \times \text{ancho})}$ . La inhibición del crecimiento desde el inicio del tratamiento se estimó por comparación de las diferencias en el volumen del tumor entre los grupos de control y tratados. Para todos los ratones el estudio se detuvo después de 28 días. Para todos los ratones, los tumores se extirparon y se registraron los pesos a la terminación del estudio.

Tabla 4. Efecto del tratamiento en el crecimiento del tumor

Tratamiento	Inhibición del crecimiento del tumor de control el día 28	valor de P (prueba t para dos muestras emparejadas)
AZD2171 (1.5mg/kg/día p.o, d 0 - 27)	55 %	0.0006
3.19.3 (10 mg/kg i.p, día 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24)	40%	0.0001
AZD2171 + 3.19.3	81%	<0.0001

25 Como se ilustró en la Figura 3a, y la Tabla 4, la combinación de mAb 3.19.3 con AZD2171 produjo una inhibición del crecimiento del tumor significativamente mayor que 3.19.3 solo (P<0.0001 para un solo agente vs. la combinación: valor de P se obtuvo por la prueba t para dos muestras emparejadas al asumir igual varianza). No se observó toxicidad adicional con las combinaciones en comparación con el tratamiento del agente individual solo como se determinó por los cambios en el peso corporal (Figura 3b). Estos resultados demuestran que el tratamiento combinado con el mAb 3.19.3 anti-Ang2 y el inhibidor de VEGF AZD2171 conduce a mejoras en la eficacia sin toxicidad aditiva en modelos pre-clínicos y proporciona bases para una mayor investigación clínica de esta combinación.

30 Determinación de la eficacia terapéutica del mAb 3.19.3 en conjunto con Zactima™ en xenoinjertos del tumor de colon LoVo humano

35 La actividad antitumoral del anticuerpo monoclonal 3.19.3 se evaluó en el modelo de xenoinjerto de cáncer colorrectal LoVo. En resumen, las células LoVo se cultivaron en frascos como de rutina hasta que las células alcanzaron la sub-confluencia.

Se usaron ratones desnudos NCr machos de 8 semanas de edad inmunodeficientes. Las suspensiones celulares que contenían  $3 \times 10^6$  se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones, y después de que el volumen del tumor alcanzó  $200\text{mm}^3$ , los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos y se iniciaron los tratamientos. El mAb 3.19.3 10mg/kg en solución salina se inyectó por vía intraperitoneal, dos veces por semana durante 2 semanas. Zactima™ se trató por vía oral diariamente en dosis en el intervalo a partir de 25 a 50mg/kg en agua que contenía 1% de Tween80. Las dimensiones de cada tumor se midieron dos veces por semana. El volumen del tumor se calculó como: volumen = longitud x (ancho)<sup>2</sup> x 0.5 (cm<sup>3</sup>). Como se ilustra en la Figura 4a, el mAb 3.19.3 y Zactima™ retrasaron significativamente el crecimiento de los tumores LoVo como agentes individuales. Sin embargo la combinación de mAb 3.19.3 y ZD6474 tuvo un efecto significativamente mayor que los agentes individuales solos como se ilustra por los siguientes valores de inhibición del tumor:

**3.19.3 (10mg/kg 2xsemanas) = 48%; (p<0.001)**

**Zactima™ (50mg/kg/día) = 46%; (p<0.001)**

**Combinación 3.19.3 + Zactima™ = 83% inhibición (p<0.001 para la combinación vs. el agente solo)**

No se observó toxicidad adicional con las combinaciones en comparación con el tratamiento del agente individual solo como se determinó por los cambios en el peso corporal (Figura 4b). Estos resultados demuestran que el tratamiento combinado con el mAb 3.19.3 anti-Ang2 y el inhibidor de VEGF Zactima™ conduce a mejoras en la eficacia sin toxicidad aditiva en modelos pre-clínicos y proporciona bases para una mayor investigación clínica de esta combinación.

Determinación de la eficacia terapéutica del mAb 3.19.3 en conjunto con el mAb DC 101 en xenoinjertos de tumores de colon SW620 humano

Se evaluó la actividad anti-tumoral del mAb 3.19.3 en conjunto con el anticuerpo monoclonal DC101 que está dirigido contra VEGFR-2 /KDR, en el modelo de xenoinjerto de cáncer colorrectal SW620. En resumen, células SW620 se cultivaron bajo condiciones de cultivo de tejidos de rutina en frascos hasta que las células alcanzaron la sub-confluencia. Se usaron ratones desnudos NCr de 8-10 semanas de edad inmunodeficientes, y suspensiones de células que contenían aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones. Después de que los volúmenes de los tumores alcanzaron  $100\text{mm}^3$ , los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos y se iniciaron los tratamientos. El mAb 3.19.3 10mg/kg en solución salina se inyectó por vía intraperitoneal, dos veces por semana durante 3 semanas. El mAb DC101 15mg/kg en solución salina además se inyectó por vía intraperitoneal, según el mismo programa de dos veces por semana durante 3 semanas. Las dimensiones de cada tumor se midieron dos veces por semana. El volumen del tumor se calculó como: volumen = longitud x (ancho)<sup>2</sup> x 0.5 (cm<sup>3</sup>). Como se ilustra en la Figura 5a, la combinación del mAb 3.19.3 y DC101 muestra una actividad significativamente mayor que cualquier agente individual solo. Esto además se ilustra mediante los siguientes valores de inhibición del tumor:

**3.19.3 (10mg/kg 2xsemanas) = 48%; (p<0.03)**

**DC101 (15mg/kg 2xsemanas) = 66%; (p<0.01)**

**Combinación 3.19.3 + DC101 = 93% inhibición (p<0.001 para la combinación vs. el agente solo)**

No se observó toxicidad adicional con las combinaciones en comparación con el tratamiento del agente individual solo como se determinó por los cambios en el peso corporal (Figura 5b). Estos resultados demuestran que el tratamiento combinado con el mAb 3.19.3 anti-Ang2 y el anticuerpo DC101 anti-VEGFR-2 conduce a mejoras significativas en la eficacia sin toxicidad aditiva en modelos pre-clínicos. Estos datos proporcionan base para una mayor investigación clínica del tratamiento con el mAb 3.19.3 anti-Ang2 junto con otras combinaciones de anticuerpos anti-angiogénicos que incluyen AVASTIN™.

Determinación de la eficacia terapéutica del mAb 3.19.3 en conjunto con AVASTIN™ en xenoinjertos de tumores humanos

La actividad antitumoral del anticuerpo monoclonal 3.19.3 en conjunto con AVASTIN™ se puede evaluar en modelos de xenoinjertos de tumores humanos. A431, Colo205, LoVo u otras células se pueden cultivar en frascos de cultivo como rutina hasta que las células alcanzan la sub-confluencia. Los ratones desnudos NCR machos o hembras de 7-10 semanas de edad inmunodeficientes se pueden emplear para el desarrollo de modelos. Las células se pueden recoger, suspender en Matrigel, y después se inyectan por vía subcutánea en cada ratón. Los ratones después se pueden aleatorizar en cohortes

que contienen 8-10 ratones. El AVASTIN™ y el mAb 3.19.3 se pueden administrar por inyección intraperitoneal o intravenosa. Las dimensiones de cada tumor pueden medirse dos veces por semana. El volumen del tumor puede calcularse como: Volumen = Longitud x (Ancho)<sup>2</sup> x 0.5 cm<sup>3</sup>, o por medición del calibrador de Vernier bilateral y, tomando la longitud del diámetro más largo a través del tumor y el ancho correspondiente perpendicular, calculado usando la fórmula  $(\pi/6) \times (\text{longitud} \times \text{ancho}) \times \sqrt{(\text{longitud} \times \text{ancho})}$ . La inhibición del crecimiento desde el inicio del tratamiento puede estimarse mediante la comparación de las diferencias en el volumen del tumor entre los grupos de control y tratados.

La combinación del mAb 3.19.3 en conjunto con el tratamiento con AVASTIN™ se espera que produzca una inhibición significativamente mayor del crecimiento del tumor que cualquier agente individual solo (P<0.01 para el agente individual vs. combinación: con valores de P obtenidos por la prueba t para dos muestras emparejadas al asumir igual varianza).

Determinación de la eficacia terapéutica del mAb 3.19.3 en conjunto con SU11248 (Sutent) o BAY43-9006 (Sorafinib) en xenoinjertos de tumores humanos

La actividad antitumoral del anticuerpo monoclonal 3.19.3 en conjunto con Sutent o Sorafinib se puede evaluar en modelos de xenoinjertos de tumores humanos. HT29, A431, Colo205, LoVo u otras células de tumores humanos se pueden cultivar en frascos de cultivo como rutina hasta que las células alcanzan la sub-confluencia. Ratones desnudos NCR machos o hembras de 7-10 semanas de edad inmunodeficientes se pueden emplear para el desarrollo de modelos. Las células se pueden recoger, suspender en Matrigel, y después se inyectan por vía subcutánea en cada ratón. Los ratones después se pueden aleatorizar en cohortes que contienen 8-10 ratones. El Sutent y el mAb 3.19.3 se pueden administrar por inyección intraperitoneal o intravenosa de acuerdo a la tabla más abajo.

Grupo	Compuesto	Programa	Dosis (mg/kg)	# Animales
1	Vehículo	b.i.d.x21		10
2	3.19.3	2x/semana por 3 semanas	10	9
3	Sutent	b.i.d.x21	40	9
4	Sutent	b.i.d.x21	80	9
5	Sutent	b.i.d.x21	40	9
	3.19.3	2x/semana por 3 semanas	10	
6	Sutent	b.i.d.x21	80	9
	3.19.3	2x/semana por 3 semanas	10	

Las dimensiones de cada tumor pueden medirse dos veces por semana. El volumen del tumor puede calcularse como: Volumen = Longitud x (Ancho)<sup>2</sup> x 0.5 cm<sup>3</sup>, o por medición del calibrador de Vernier bilateral y, tomando la longitud del diámetro más largo a través del tumor y el ancho correspondiente perpendicular, calculado usando la fórmula  $(\pi/6) \times (\text{longitud} \times \text{ancho}) \times \sqrt{(\text{longitud} \times \text{ancho})}$ . La inhibición del crecimiento desde el inicio del tratamiento puede estimarse mediante la comparación de las diferencias en el volumen del tumor entre los grupos de control y tratados.

La combinación del mAb 3.19.3 en conjunto con el tratamiento con Sutent o Sorafinib se espera que produzca una inhibición significativamente mayor de crecimiento del tumor que cualquier agente individual solo (P<0.01 para el agente individual vs. combinación: con valores de P obtenidos por la prueba t para dos muestras emparejadas al asumir igual varianza).

Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de las regiones variables de los anticuerpos monoclonales como se enumeran en la Tabla 1 se muestran más abajo.

Anticuerpo Monoclonal 3.3.2 Anti-Ang-2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGT  
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGG  
AAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAC  
AACGCCAAGA AACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG  
GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAAGGTATAGCAGTGGCTGGGCCCTTTGACT  
ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC (SEQ ID NO: 1)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGS  
EKYYVDSVKGRFTISRDNÁKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQGI AVAGPFDYW  
GQGLTVTVSSA (SEQ ID NO: 2)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAG  
CCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTGTTAGCAGCGACTTAGCCTGGTACCA  
GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCATTAGGGCC  
ACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA  
CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTCCTGTCAGCAGTATTAT  
AACTGGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAA (SEQ ID

10

NO: 3)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSDLAWYQKPGQAPRLLIYGASIRATGIP  
ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYSCQYYNWWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
4)

15

**Anticuerpo Monoclonal 3.19.3 Anti-Angiopoyetina-2**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCACTAACTATGGCATGCACTGGG  
GCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCACATGATG  
GAAATAATAAGTATTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA  
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACAC  
GGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGAATCGATTTTTGGAGTGGCCTCAACTGG  
TTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC (SEQ ID NO: 5)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

5 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTNYGMHWGRQAPGKGLEWVAVISHDG  
NNKYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIDFWSGLNWF  
PWGQGLVTVSSA (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG  
CCACTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTACCGGCAGCTACTTAGCCTGGTA  
CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGACTCCTCATCTGTGGTGCATCCAGCTGG  
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTC  
TCACCATCAGTAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTA  
TAGTAGTTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGA  
10 (SEQ ID NO: 7)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSITGSYLAWYQKPGQAPRLLICGASSWATGI  
PDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQYSSSPITFGQGRLEIKR (SEQ ID NO:  
8)

15 Anticuerpo Monoclonal 3.31.2 Anti-Ang-2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGT  
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGG  
AAGTGACAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC  
20 AACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCGAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG

GCTGTGTTTTACTGTGCGAGAGATATGGGCAGTGGCTGGTTTACTACTGGGGCC  
 AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC (SEQ ID NO: 9)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGS  
 DKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLRMNSLRAEDTAVFYCARDMGSGWFDYWGQG  
 TLVTVSSA (SEQ ID NO: 10)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

GAAGTAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAG  
 CCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGCAACTTAGCCTGGTACCA  
 GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCC  
 ACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA  
 CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTGCTGTCAGCAGTATAAT  
 CACTGGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:  
 10 11)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

15 EVVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATG  
 IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYCCQYNHWWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID  
 NO: 12)

**Anticuerpo Monoclonal 5.16.3 Anti-Ang-2**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

20 CAGGTACAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG  
 AAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCGGCTTCTATATGTACTGGGT  
 GCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAG  
 TAGTGGCACAAACCATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGA  
 CACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACAC  
 GGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAGGATATAGCAACAGCTGGTCCCTTTGAC  
 TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC (SEQ ID NO: 13)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGFYMYWVRQAPGQGLEWMGWINPN  
 SSGTNHAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDQDIATAGPFDY  
 WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAG  
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCA  
GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTTTGGTGCATCCACCCGGGCC  
ACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA  
CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAT  
AACTGGTGGACGTTCCGGCCGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAA (SEQ ID  
NO: 15)

5

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQKPGQAPRLLIFGASTRATGIP  
ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNWWTFRGRTKVEIKR (SEQ ID NO:  
16)

10 Anticuerpo Monoclonal 5.28.1 Anti-Ang-2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAATCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATACCATGCACTGGGT  
CCGTCAAACCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCTTATTAGTTGGGATGGT  
GGTAGCACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA  
ACAGCAAAAACCTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACCG  
CCTTGATTACTGTGCAAAGATATAGATATAGCAGTGGCTGGTACAGGATTTGA  
CCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT (SEQ ID NO: 17)

15

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGIVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQTPGKGLEWVSLISWDGG  
STYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKDIDIAVAGTGFDPHWG  
QGTLVTVSSA (SEQ ID NO: 18)

20 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAG  
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTACCAGCAACCTAGCCTGGTACCA  
GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATTAATTAGGGCC  
ACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA  
CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAAT

AACTGGCCATTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGA (SEQ ID NO: 19)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

5 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVTSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGALIRATGIP  
ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPFTFGPGTKVDIKR (SEQ ID NO: 20)

Anticuerpo Monoclonal 5.78.3 Anti-Ang-2

10 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG  
AAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCGGCTACTATATGCACTGGG  
TGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACA  
GTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGG  
ACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACA  
CGGCCGTGTACTACTGTGCGAGAGATAGGGGCTGGAACCTACGCAGACTACTACTA  
CTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCT  
(SEQ ID NO: 21)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPN  
SGGTNYAQKFRVMTDRDTSISTAYMELSRSDDTAVYYCARDRGWNYADYYY  
YGMDVWGQGTITVTVSSA (SEQ ID NO: 22)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGG  
CCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTATTTATACAGTTCCAACAATCAGAA  
CTTCTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAACTGCTCATTACT  
GGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTGAGTGGCAGCGGGTCTGG  
GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTAT  
TACTGTCACCAATATTATAGTACTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGG  
20 AGATTAAACGA (SEQ ID NO: 23)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNQNFLAWYQQKPGQPPKLLIYWA  
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQYYSTPITFGQGRLEIKR  
(SEQ ID NO: 24)

Anticuerpo Monoclonal 5.86.1 Anti-Ang-2

5

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG  
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACCATATGTACTGGG  
TGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGCTGGGATGGATCAACCCTAACA  
GTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGG  
ACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACA  
CGGCCGTGTACTGTGTGAGAGATCAGGGTATAGCAGCAGCTGGTCCCTTTGA  
CTACTGGTGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT (SEQ ID NO: 25)

10

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYHMYWVRQAPGQGLEWLGWINPNS  
GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCVRDQGIAAAGPFDYW  
CQGLVTVSSA (SEQ ID NO: 26)

15

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

GACATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAG  
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGCGCATTAGCACCTATTTAAATTGGTATCA  
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCTAGTTTGCAA  
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA  
CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTA  
CACTACCCCATTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGA (SEQ ID  
NO: 27)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DIRMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRISTYLNWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYPFTFGPGTKVDIKR (SEQ ID NO:  
28)

20

Anticuerpo Monoclonal 5.88.3 Anti-Ang-2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

GAGGTGCAGATGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTAAGAAGCTACTGGATGAGCTGGG  
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGGAAGACG  
GAAGTGAGAAATACCATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG  
ACAACGCCGAGAACTACTGTTTCTGCAAATGAGCAGCCTGCGAGCCGAGGACA  
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATATGGAAGCATCAGCTGGCCTCTTTGACTA  
CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT (SEQ ID NO: 29)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

5 EVQMVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKEDG  
SEKYHVD SVKGRFTISRDN AENSLFLQMSLRAEDTAVYYCARDMEASAGLFDYWG  
QGTLVTVSSA (SEQ ID NO: 30)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

GAAATAGTGATGACGCAGTCCCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAG  
CCATCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCA  
GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCC  
ACTGGTATCCCAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA  
CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAT  
TACTGGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:  
10 31)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

EIVMTQSPATLSVSPGERAILSCRASQSISSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIP  
ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNYWWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
15 32)

Anticuerpo Monoclonal 5.101.1 Anti-Ang-2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG  
AAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCGGCTACTATATGCACTGGG  
TGCCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACA  
20 GTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGG

ACACGTCCATCAGCACAGCTTACATGGAGCTGAGGAGGCTGAGATCTGACGACA  
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGGGTAGTATACCAGTGTCTGGTCACTT  
TGACTACTGGGGGCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT (SEQ ID NO: 33)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHWPQAPGQGLEWMGWINPN  
SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELRRLRSDDAVYYCARDGGSIPVSGHFD  
YWGQGTLVTVSSA (SEQ ID NO: 34)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAG  
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTATCAGCAACTTAGCCTGGTACCA  
GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTTTGGTGCATCCACCAGGGCC  
ACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA  
CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCATCAGTATAAT  
AACTGGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:  
10 35)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLISNLAWYQQKPGQAPRLLIFGASTRATGIP  
ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYCHQYNNWWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
15 36)

Anticuerpo Monoclonal 5.103.1 Anti-Ang-2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAAAGCCTGGGGCCTCAGTC  
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATTTGTAAGGGT  
GCCACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCCCTAACAG  
TGGTGGCACAACACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGA  
CACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACAC  
GGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAGGTCATAGCAGTAGCTGGTCCCTTTGAC  
20 TACTGGGCCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT (SEQ ID NO: 37)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYLYWVPQAPGQGLEWMGWISPNS  
GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDQVIAVAGPFDYW  
AQGTLVTVSSA (SEQ ID NO: 38)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5  
GAAACAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAG  
TCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTATCAGCAGCTTAGCCTGGTACCA  
GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCC  
ACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA  
CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAT  
AATTGGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:  
39)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

ETVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSVISLAWYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIP  
ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNWWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
10 40)

15 La descripción escrita anterior se considera suficiente para permitir que una persona con experiencia en la materia lleve a la práctica la invención. La descripción y los ejemplos anteriores detallan ciertas modalidades preferidas de la invención y describe el mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que independientemente de lo detallado que lo anterior puede aparecer en el texto, la invención puede llevarse a la práctica de muchas formas y la invención debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones anexadas y cualquier equivalente de estas.

20 **LISTA DE SECUENCIAS**

<110> AstraZeneca AB

25 <120> COMBINACIONES

<130> CCH 102111

<160> 40

30 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 366

35 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 411 505 T3

<400> 1  
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60  
tctctgtcag tctctggatt cacctttagt agctattgga tgagctgggt cgcaggct 120  
ccaggggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180  
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcaa 300  
ggtatagcag tggctgggccc ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360  
tcagcc 366

5 <210> 2  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

<400> 2  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Asp Gln Gly Ile Ala Val Ala Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
115 120

10 <210> 3  
<211> 322  
<212> ADN  
15 <213> Homo sapiens

<400> 3  
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gggccagtca gactgttagc agcgacttag cctggtacca gcagaaacct 120  
ggccaggctc ccaggctcct catctatgga gcatccatta gggccactgg tatcccagcc 180  
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240  
gaagatcttg cagtttatc ctgtcagcag tattataact ggtggacggt cggccaaggg 300  
accaaggtgg aaatcaaacg aa 322

ES 2 411 505 T3

<210> 4  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

5

<400> 4  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Ser Ser Asp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Trp Trp Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 5  
 <211> 372  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 5  
 caggtgcagc tggtaggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcact aactatggca tgcactgggg ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcacatg atggaaataa taagtattat 180  
 gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggga 300  
 atcgattttt ggagtggcct caactgggtc gaccctctggg gccagggaac cctggtcacc 360  
 gtctcctcag cc 372

15

<210> 6  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

20

ES 2 411 505 T3

<400> 6

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

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

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

Ala Val Ile Ser His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Asp Phe Trp Ser Gly Leu Asn Trp Phe Asp Pro  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
115 120

<210> 7

5 <211> 327

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 7

gaaatttgtg tgacgcagtc tccaggcacc ctgtccttgt ctccagggga aagagccact 60

ctctcctgca gggccagtca gagtattacc ggcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccagact cctcatctgt ggtgcatcca gctgggccac tggcatcca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag tagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatagta gttcaccgat caccttcggc 300

10 caagggacac gactggagat taaacga 327

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

15 <213> Homo Sapiens

<400> 8

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

ES 2 411 505 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Gly Ser  
 20 25 30

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

Ile Cys Gly Ala Ser Ser Trp Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro  
 85 90 95

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

<210> 9

<211> 357

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttagt agctattgga tgagctgggt cgcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga caaatactat 180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcgaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt ttactgtgc gagagatag 300

ggcagtggtt ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcc 357

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Arg Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys

ES 2 411 505 T3

		85		90		95										
	Ala	Arg	Asp	Met	Gly	Ser	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				100					105					110		
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala									
			115													
5	<210>	11														
	<211>	321														
	<212>	ADN														
	<213>	Homo Sapiens														
	<400>	11														
	gaagtagtga	tgacgcagtc	tccagccacc	ctgtctgtgt	ctccagggga	aagagccacc										60
	ctctcctgca	gggccagtca	gagtggtggc	agcaacttag	cctggtacca	gcagaaacct										120
	ggccaggctc	ccaggctcct	catctatggt	gcatccacca	gggccactgg	tatcccagcc										180
	aggttcagtg	gcagtggtgc	tgggacagag	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagtct										240
	gaagattttg	cagtttatg	ctgtcagcag	tataatcact	ggtggacggt	cggccaaggg										300
10	accaaggtgg	aatcaaacg	a													321
	<210>	12														
	<211>	107														
	<212>	PRT														
15	<213>	Homo sapiens														
	<400>	12														
	Glu	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
	1				5					10					15	
	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Ser	Asn
			20						25					30		
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
		50				55						60				
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser
	65				70						75					80
	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Cys	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	His	Trp	Trp	Thr
				85						90					95	
	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg					
			100						105							
20	<210>	13														
	<211>	365														
	<212>	ADN														
	<213>	Homo Sapiens														

ES 2 411 505 T3

<400> 13  
caggtacagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
tcttgcaagg cttctggata caccttcacc ggcttctata tgtactgggt gcgacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtagtgg cacaacccat 180  
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240  
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcag 300  
gatatagcaa cagctggtcc ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360  
tcagc 365

5  
<210> 14  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10  
<400> 14  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe  
20 25 30  
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Ser Gly Thr Asn His Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Asp Gln Asp Ile Ala Thr Ala Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

15  
<210> 15  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

20  
<400> 15  
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120  
ggccaggctc ccaggctcct catctttggt gcatccaccc gggccactgg tatcccagcc 180  
aggttcagtg gcagtggttc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240  
gaagatcttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggtggacgtt cggccgaggg 300  
accaaggtgg aatcaaacg aa 322

<210> 16  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

5

<400> 16  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Trp Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 17  
 <211> 369  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens

10

<400> 17  
 gaagtgcagc tggtaggagtc tgggggaatc gtggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatacca tgcactgggt ccgtaaact 120  
 ccggggaagg gtctggagtg ggtctctctt attagttggg atggtggtag cacatactat 180  
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acagcaaaaa ctcccctgat 240  
 ctgcaaatga acagtctgag aactgaggac accgccttgt attactgtgc aaaagatata 300  
 gatatagcag tggctggtac aggatttgac cactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360  
 15 tcctcagct 369

<210> 18  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 18  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ile Val Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 411 505 T3

35

40

45

Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ile Asp Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Phe Asp His Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
115 120

- 5 <210> 19
- <211> 324
- <212> ADN
- <213> Homo Sapiens

<400> 19  
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttacc agcaacctag cctggtacca gcagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcattaatta gggccactgg tatcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240  
 gaagatthtg cagtttatta ctgtcagcaa tataataact ggccattcac tttcggccct 300  
 10 gggaccaaag tggatatcaa acga 324

- 15 <210> 20
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> Homo Sapiens

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

ES 2 411 505 T3

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
 100 105

5 <210> 21  
 <211> 378  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens

<400> 21  
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcttgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180  
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240  
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatagg 300  
 ggctggaact acgcagacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360  
 10 gtcaccgtct cctcagct 378

<210> 22  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Gly Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120 125

20 <210> 23  
 <211> 342  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 411 505 T3

<400> 23  
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagttcca acaatcagaa cttcttagct 120  
 tggatcagc agaaaccagg acagcctcct aaactgctca ttactgggc atctaccgg 180  
 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaccaata ttatagtact 300  
 ccgatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaaac ga 342  
 5  
 <210> 24  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 10  
 <400> 24  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asn Asn Gln Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys Arg  
 15  
 <210> 25  
 <211> 366  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 25  
 caggtgcagc tgggtgcagtc cggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcttgcaagg cttctggata caccttcacc ggctaccata tgtactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gctgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180  
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240  
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgt gagagatcag 300  
 ggtatagcag cagctggtcc ctttgactac tgggtgccagg gaaccctggt cacctgtctcc 360  
 20  
 tcagct 366

ES 2 411 505 T3

<210> 26  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

5

<400> 26  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 His Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Asp Gln Gly Ile Ala Ala Ala Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Cys  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120

<210> 27  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 27  
 gacatccgga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctggttgaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca ggcattagc acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagttcct gatctatgct gcatctagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacacta cccattcac tttcggcct 300  
 15 gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 28  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 28  
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Thr Tyr  
 20 25 30

ES 2 411 505 T3

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
 100 105

5 <210> 29  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens

<400> 29  
 gaggtgcaga tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60  
 tctctgtgcag cctctggatt caccttaaga agctactgga tgagctgggt cgcaggct 120  
 ccagggaaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaaggaag acggaagtga gaaataccat 180  
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccgagaa ctactgttt 240  
 ctgcaaataga gcagcctgcg agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatatg 300  
 gaagcatcag ctggcctctt tgactactgg ggccagggaa ccttgggtcac cgtctctca 360  
 10 gct 363

15 <210> 30  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

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

ES 2 411 505 T3

Ala Arg Asp Met Glu Ala Ser Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120

5 <210> 31  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 31  
 gaaatagtga tgacgcagtc cccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccatc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccacca gggccactgg tatccagacc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240  
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataattact ggtggacggt cggccaaggg 300  
 accaaggtgg aatcaaacg a 321

10 <210> 32  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

15 <400> 32  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Tyr Trp Trp Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

20 <210> 33  
 <211> 369  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 411 505 T3

<400> 33  
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gccacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180  
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagettac 240  
 atggagctga ggaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 300  
 ggtagtatac cagtgtctgg tcactttgac tactgggggc agggaaccct ggtcaccgtc 360  
 tcctcagct 369  
 5  
 <210> 34  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 10  
 <400> 34  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Pro Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Gly Gly Ser Ile Pro Val Ser Gly His Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120  
 15  
 <210> 35  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 20  
 <400> 35  
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtcttata agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catctttggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240  
 gaagatthtg cagthttatta ctgtcatcag tataataact ggtggacggt cggccaaggg 300  
 accaaggtgg aatcaaacg a 321

<210> 36  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 36  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ile Ser Asn  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Asn Asn Trp Trp Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 37  
 <211> 366  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens

10

<400> 37  
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaaaaagc ctggggcctc agtcaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactatt tgtactgggt gccacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcageccta acagtgggtgg cacaaactat 180  
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240  
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggcctgtg attactgtgc gagagatcag 300  
 gtcatagcag tagctggtcc ctttgactac tgggccaag gaaccctggt caccgtctcc 360  
 tcagct 366

15

<210> 38  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

20

<400> 38  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Leu Tyr Trp Val Pro Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

ES 2 411 505 T3

Gly Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gln Val Ile Ala Val Ala Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Ala  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
115 120

5 <210> 39  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Homo Sapiens

<400> 39  
gaaacagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagtcacc 60  
ctctcctgca gggccagtca gagggttacc agcagcttag cctggtacca gcagaaacct 120  
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180  
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240  
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataatt ggtggacggt cggccaaggg 300  
10 accaaggtgg aatcaaacy a 321

15 <210> 40  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

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

100

105

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una combinación de un antagonista de anticuerpo de la actividad biológica de la Angiopoyetina-2, que inhibe la unión Ang-2/Tie-2, y un antagonista de la actividad biológica de:
- 10 I. VEGF-A, y/o  
II. KDR, y/o  
III. Flt1.
- 15 en donde el antagonista del anticuerpo de la Angiopoyetina-2 es un anticuerpo que comprende:
- (a) una región VH que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6;  
y  
(b) una región VL que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8  
y
- 20 2. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el antagonista del anticuerpo de la Angiopoyetina-22 es un anticuerpo que comprende:
- (a) una región VH que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6;  
y  
(b) una región VL que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8  
y
- 25 3. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde el antagonista del anticuerpo de la Angiopoyetina-2 contiene sustituciones conservadoras de aminoácidos.
- 30 4. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el antagonista de anticuerpo de la Angiopoyetina-2 sólo contiene sustituciones conservadoras de aminoácidos fuera de las regiones CDR.
5. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el antagonista de la Angiopoyetina-2 es un anticuerpo monoclonal completamente humano.
- 35 6. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende
- (a) una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6; y  
(b) una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8.
- 40 7. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el anticuerpo comprende:
- (a) una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6; y  
(b) una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8.
- 45 8. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 es un anticuerpo.
- 50 9. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 8 en donde el antagonista de la actividad biológica de KDR es DC101.
10. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el antagonista de la actividad biológica de VEGF-A es un anticuerpo.
- 55 11. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 10 en donde el antagonista de la actividad biológica de VEGF-A es Avastin.
12. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 es un inhibidor de tirosina cinasa.

- 5
13. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 se selecciona de Zactima™, AZD2171, SU11248, SU14813, Vatalanib, BAY43-9006, XL-647, XL-999, AG-013736, AMG706, BIBF1120, TSU68, GW786034, AEE788, CP-547632, KRN 951, CHIR258, CEP-7055, OSI-930, ABT-869, E7080, ZK-304709, BAY57-9352, L-21649, BMS582664, XL-880, XL-184 o XL-820.
- 10
14. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 13 en donde el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 se selecciona de Zactima™, AZD2171, SU11248 o BAY 43-9006.
- 15
15. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 14 en donde el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 es Zactima™.
16. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 14 en donde el antagonista de la actividad biológica de KDR o Flt1 es AZD2171.
17. Una composición farmacéutica que comprende una combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 20
18. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para usar en antagonizar la actividad biológica de la Angiopoyetina-2 y uno cualquiera de;
- I. VEGF-A, y/o
  - II. KDR, y/o
  - III. Flt1.
- 25
19. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para usar en el tratamiento de la angiogénesis relacionada con la enfermedad en un mamífero.
- 30
20. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para usar en el tratamiento cáncer en un mamífero.

Figura 1a

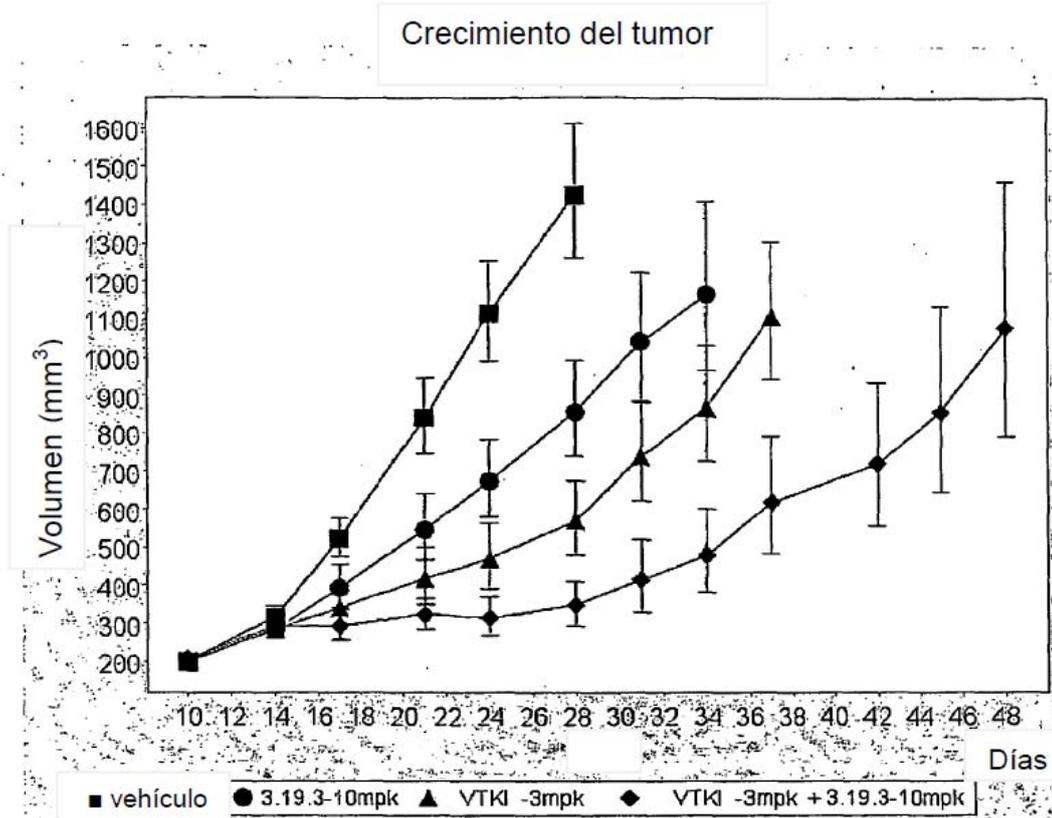


Figura 1b

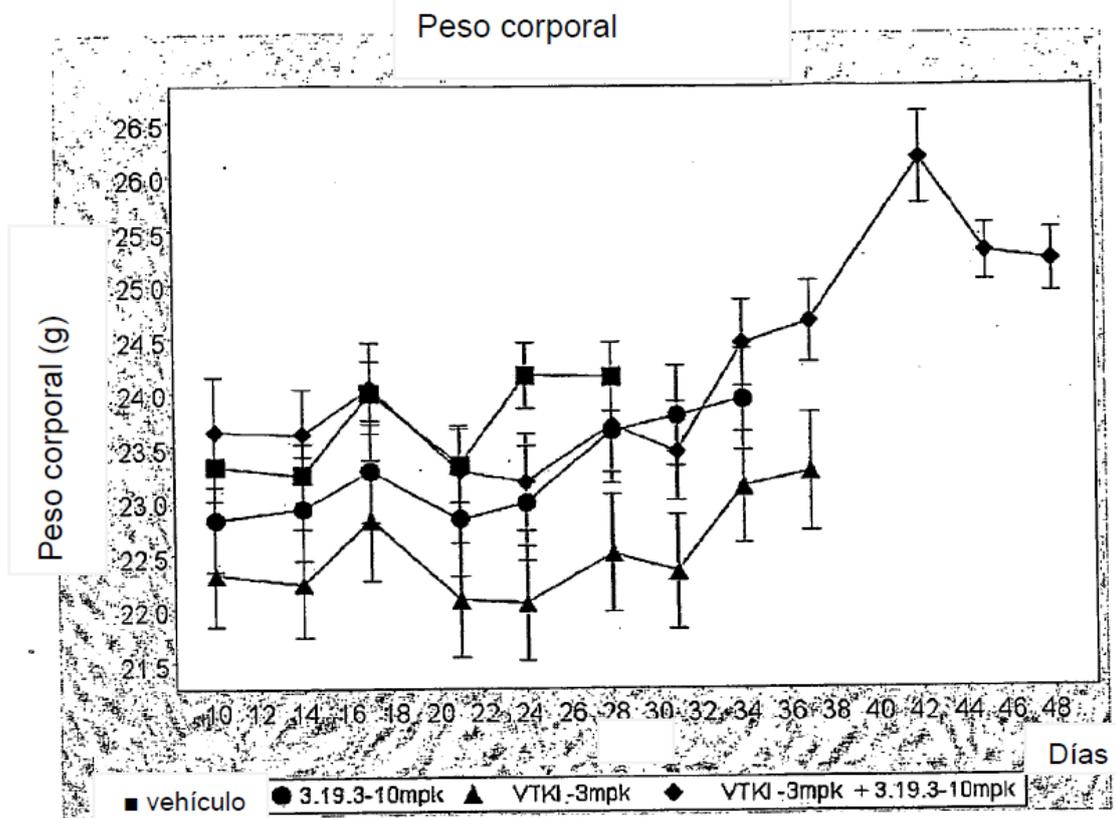


Figura 2a

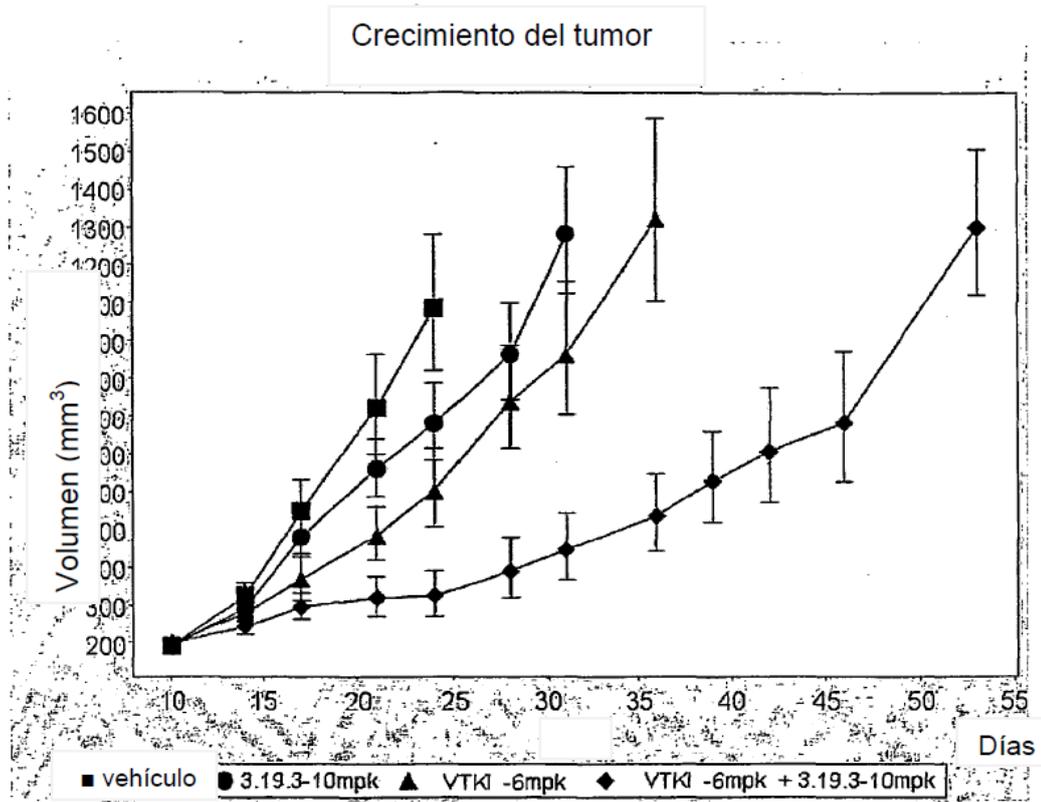


Figura 2b

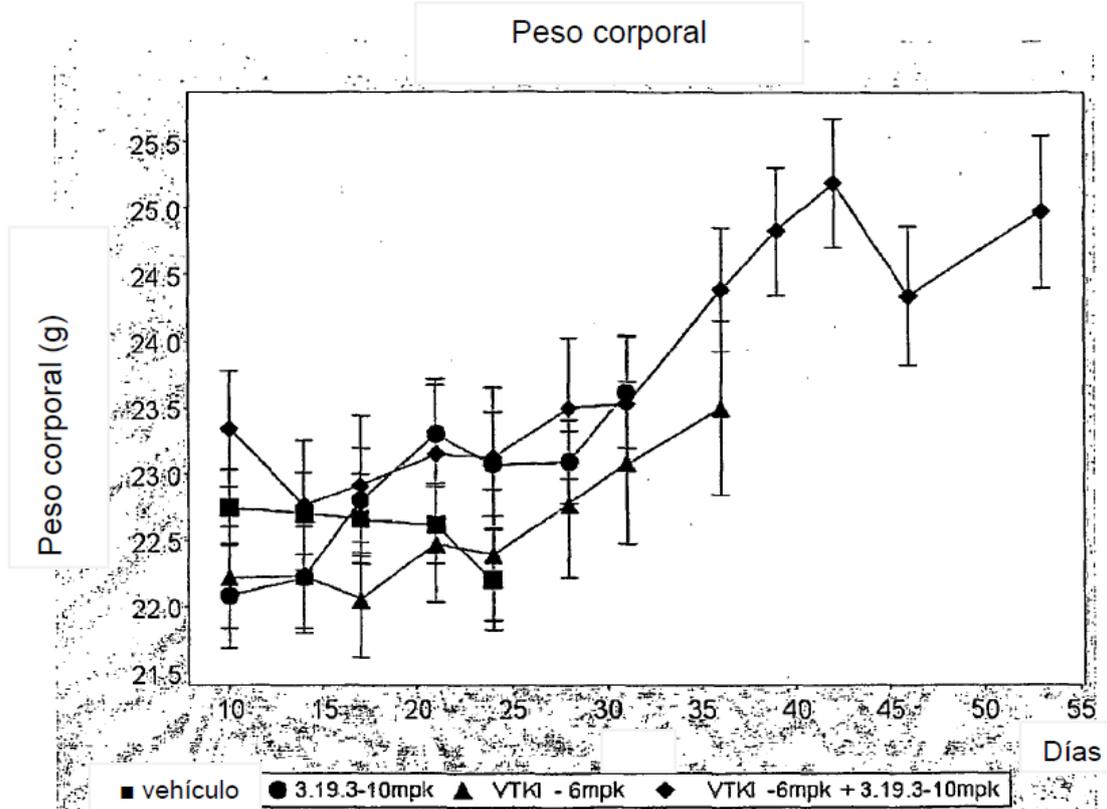


Figura 3a

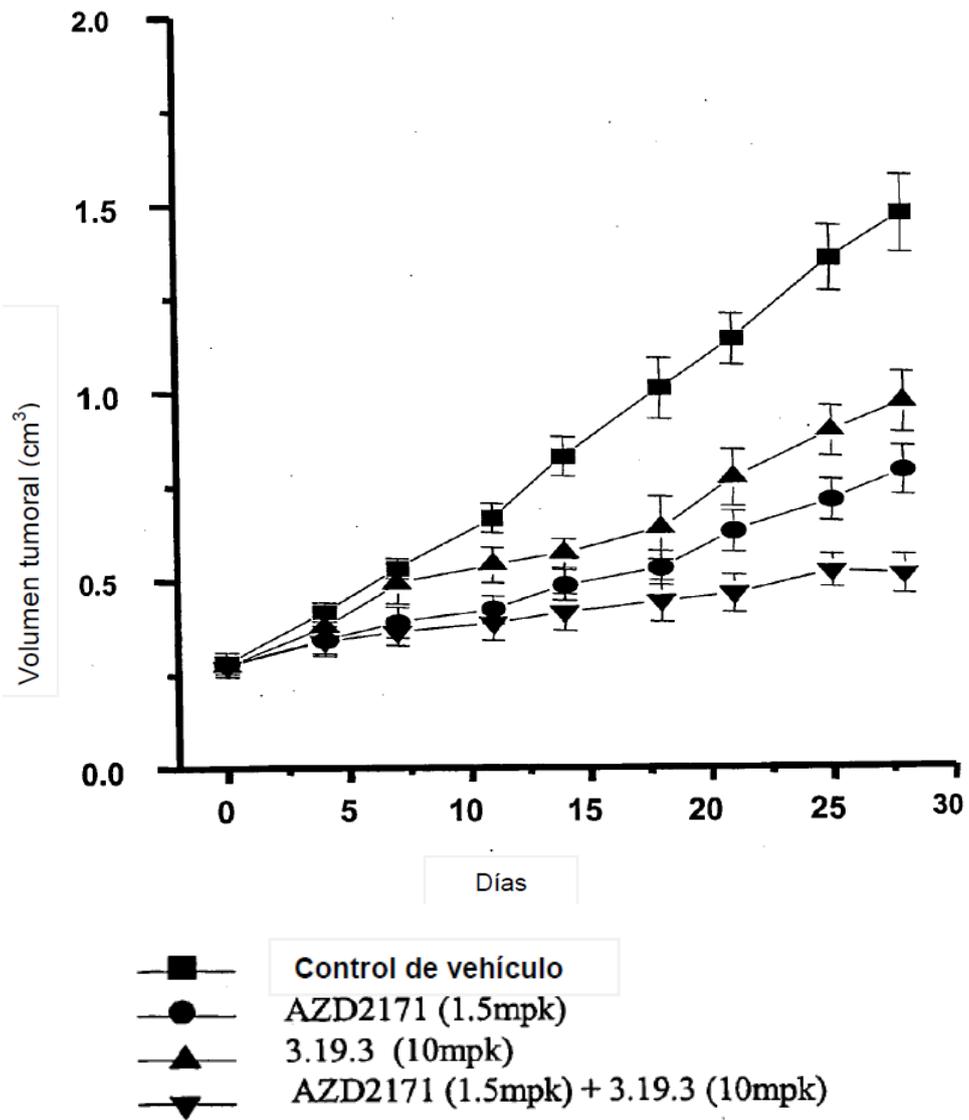


Figura 3b

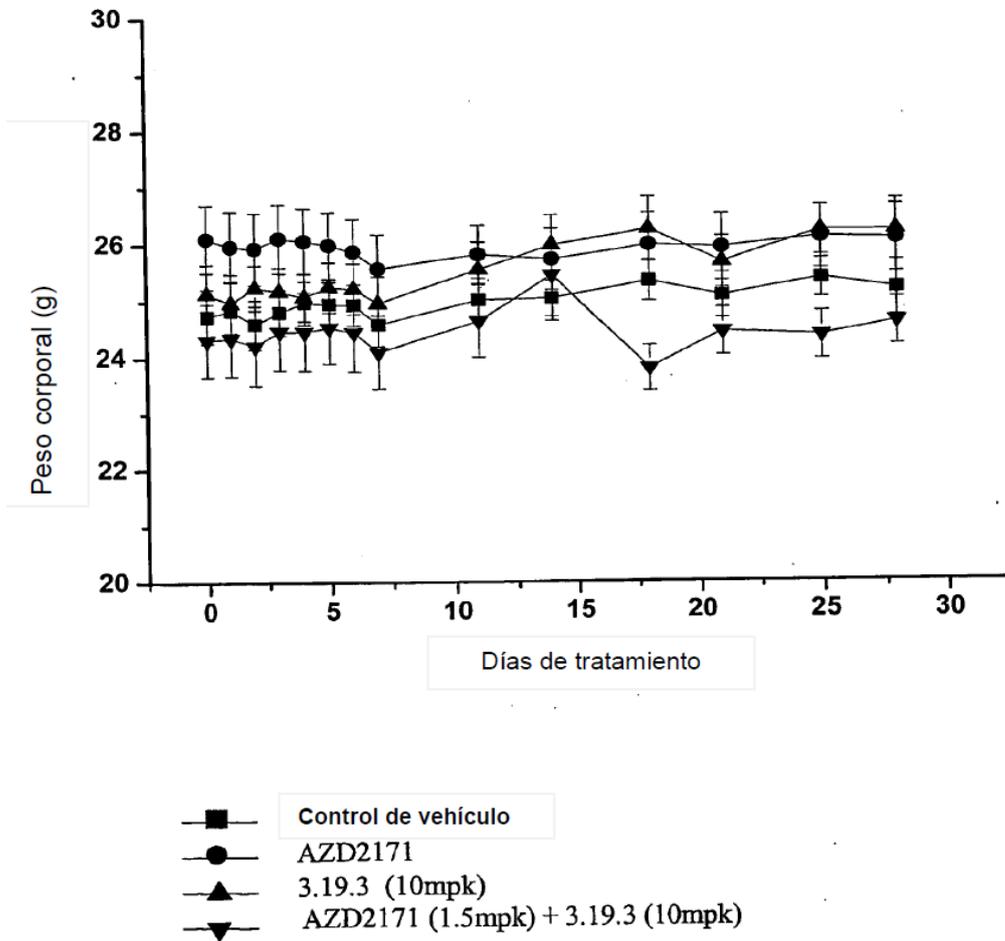


Figura 4a

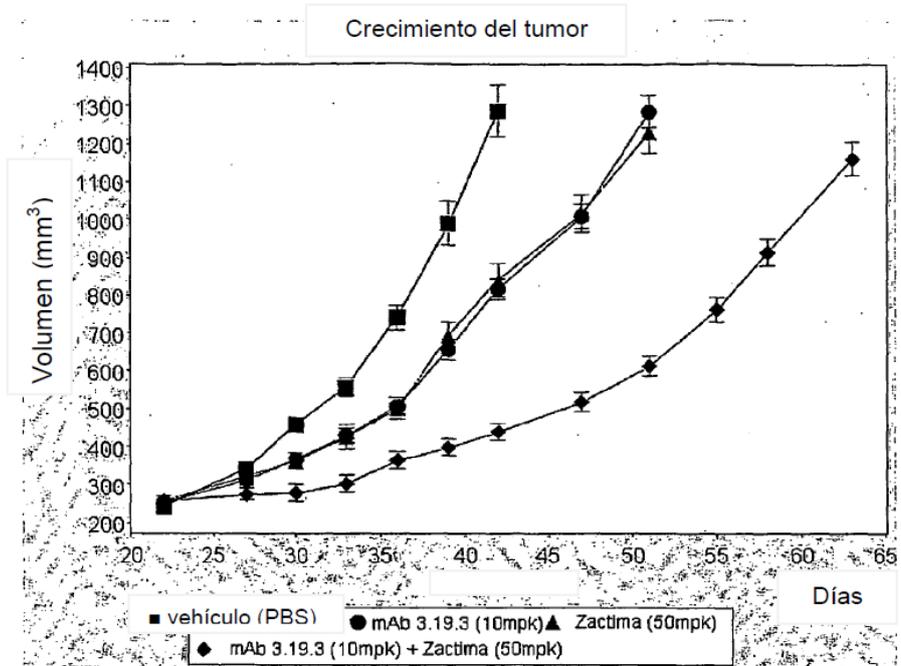


Figura 4b

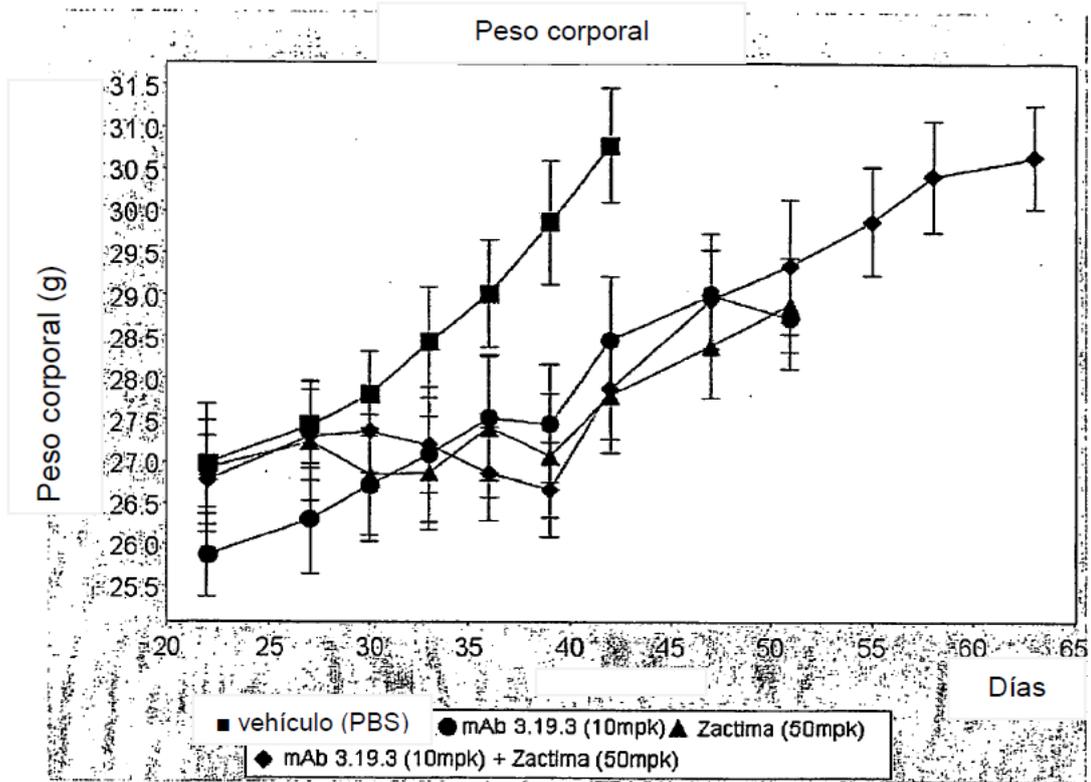


Figura 5a

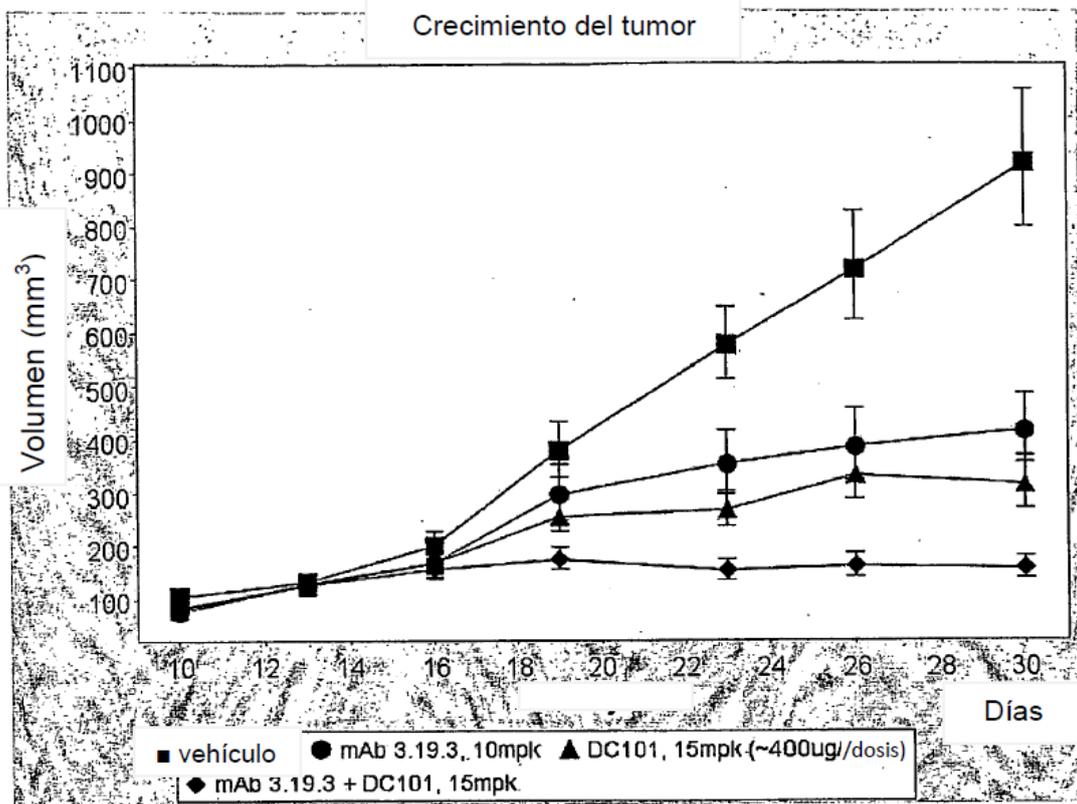


Figura 5b

