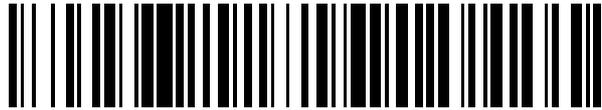


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 221**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22	(2006.01)	G01N 33/68	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)		
C07K 16/46	(2006.01)		
A61K 39/385	(2006.01)		
A61K 39/395	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
C12N 5/20	(2006.01)		
G01N 33/577	(2006.01)		
C12N 15/13	(2006.01)		
A61K 47/48	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2002 E 10011651 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2272869**

54 Título: **Agentes de unión específicos de angiopoyetina-2**

30 Prioridad:

11.10.2001 US 328604 P
10.10.2002 US 269805

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2014

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

OLINER, JONATHAN DANIEL

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 439 221 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

Agentes de unión específicos de angiopoyetina-2.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a agentes de unión específicos que reconocen y se unen a angiopoyetina-2 (Ang-2). Más específicamente, la invención se refiere a la producción, uso diagnóstico y uso terapéutico de anticuerpos monoclonales y policlonales, y fragmentos de los mismos, que específicamente se unen a Ang-2.

Antecedentes de la invención

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

15 Existen numerosas enfermedades que se sabe que están asociadas a angiogénesis no regulada o no deseada. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, neovascularización ocular, tales como retinopatías (incluyendo retinopatía diabética), degeneración macular relacionada con la edad, psoriasis, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, tal como enfermedad inflamatoria reumatoide o reumática, especialmente artritis (incluyendo artritis reumatoide), u otros trastornos inflamatorios crónicos, tales como asma crónica, aterosclerosis arterial o posterior a trasplante, endometriosis y enfermedades neoplásicas, por ejemplo los denominados tumores sólidos y tumores líquidos (o hematopoyéticos) (tales como leucemias y linfomas). Otras enfermedades asociadas a angiogénesis no deseada resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

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

40 Los fenotipos de ratón inactivado (knockout) para Tie-2 y Ang-1 son similares y sugieren que la fosforilación de Tie-2 estimulada por Ang-1 media la remodelación y estabilización de vasos en desarrollo en el útero a través del mantenimiento de la adhesión de células de soporte de células endoteliales (Dumont, D. J., *et al.*, *Genes & Development*, 8: 1897-1909 [1994]; Sato, T. N., *et al.*, *Nature*, 376: 70-74 [1995]; Suri, C., *et al.*, [1996], citado anteriormente). El papel de Ang-1 en la estabilización de los vasos se cree que se conserva en el adulto, donde se expresa de manera amplia y constitutiva (Hanahan, D., *Science*, 277: 48-50 [1997]; Zagzag, D., *et al.*, *Experimental Neurology*, 159: 391-400 [1999]). Por el contrario, la expresión de Ang-2 se limita principalmente a sitios de remodelación vascular, donde se cree que bloquea la función de Ang-1, induciendo de ese modo un estado de plasticidad vascular que conduce a angiogénesis (Hanahan, D., [1997], citado anteriormente; Holash, J., *et al.*, *Science*, 284: 1994-1998 [1999]; Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], citado anteriormente).

50 Numerosos estudios publicados han demostrado supuestamente la expresión de Ang-2 selectiva de vasos en estados patológicos asociados a angiogénesis. Estos estados patológicos incluyen, por ejemplo, psoriasis, degeneración macular y cáncer (Bunone, G., *et al.*, *American Journal of Pathology*, 155: 1967-1976 [1999]; Etoh, T., *et al.*, *Cancer Research*, 61: 2145-2153 [2001]; Hangai, M., *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42: 1617-1625 [2001]; Holash, J., *et al.*, [1999] citado anteriormente; Kuroda, K., *et al.*, *Journal of Investigative Dermatology*, 116: 713-720 [2001]; Otani, A., *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40: 1912-1920 [1999]; Stratmann, A., *et al.*, *American Journal of Pathology*, 153: 1459-1466 [1998]; Tanaka, S., *et al.*, *J Clin Invest*, 103: 34-345 [1999]; Yoshida, Y., *et al.*, *International Journal of Oncology*, 15: 1221-1225 [1999]; Yuan, K., *et al.*, *Journal of Periodontal Research*, 35: 165-171 [2000]; Zagzag, D., *et al.*, [1999] citado anteriormente). La mayoría de estos estudios se han centrado en el cáncer, en el que muchos tipos de tumores parecen presentar expresión de Ang-2 vascular. En contraposición a su expresión en angiogénesis patológica, la expresión de Ang-2 en tejidos normales es extremadamente limitada (Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], citado anteriormente; Mezquita, J., *et al.*,

Biochemical and Biophysical Research Communications, 260: 492-498 [1999]). En el adulto normal, los tres sitios principales de angiogénesis son el ovario, la placenta y el útero; estos son los tejidos primarios en tejidos normales (es decir, no cancerosos) en los que se ha detectado ARNm de Ang-2.

5 Determinados estudios funcionales sugieren que Ang-2 puede estar implicada en la angiogénesis tumoral. Ahmad *et al.* (Cancer Res., 61: 1255-1259 [2001]) describen la sobreexpresión de Ang-2 y muestran que está supuestamente asociada a un aumento en el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón. Véase también Etoh *et al.*, citado anteriormente, y Tanaka *et al.*, citado anteriormente, en los que se presentan datos que asocian supuestamente la sobreexpresión de Ang-2 con hipervascularidad tumoral. Sin embargo, por el contrario, Yu *et al.* (Am. J. Path., 158: 563-570 [2001]) notifican datos que muestran que la sobreexpresión de Ang-2 en células de carcinoma de pulmón de Lewis y carcinoma mamario TA3 prolongaba supuestamente la supervivencia de los ratones a los que se les inyectaron los transfectantes correspondientes.

15 En los últimos pocos años, diversas publicaciones han sugerido que Ang-1, Ang-2 y/o Tie-2 son una posible diana para terapia anticancerígena. Por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os}. 6.166.185, 5.650.490 y 5.814.464 describen cada una el concepto de anticuerpos anti-ligando Tie-2 y cuerpos de receptor. Lin *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 8829-8834 [1998]) inyectaron un adenovirus que expresaba Tie-2 soluble en ratones; el Tie-2 soluble supuestamente disminuyó el número y tamaño de los tumores desarrollados por los ratones. En un estudio relacionado, Lin *et al.* (J. Clin. Invest., 100: 2072-2078 [1997]) inyectaron una forma soluble de Tie-2 en ratas; este compuesto supuestamente redujo el tamaño tumoral en las ratas. Siemeister *et al.* (Cancer Res., 59: 3185-3189 [1999]) generaron líneas celulares de melanoma humano que expresaban el dominio extracelular de Tie-2, inyectaron estas líneas celulares en ratones desnudos y concluyeron que Tie-2 soluble daba como resultado supuestamente una "inhibición significativa" del crecimiento tumoral y la angiogénesis tumoral. En vista de esta información, y dado que tanto Ang-1 como Ang-2 se unen a Tie-2, no queda claro a partir de estos estudios si Ang-1, Ang-2 o Tie-2 serían dianas atractivas para terapia anticancerígena.

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

30 La fusión de una proteína o fragmento de la misma con una proteína plasmática estable tal como una región constante de Ig para mejorar la vida media de estas moléculas se ha descrito de diversas maneras (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 5.480.981; Zheng *et al.*, J. Immunol., 154: 5590-5600, (1995); Fisher *et al.*, N. Engl. J. Med., 334: 1697-1702, (1996); Van Zee, K. *et al.*, J. Immunol., 156: 2221-2230, (1996); la patente estadounidense 5.808.029, expedida el 15 de septiembre de 1998; Capon *et al.*, Nature, 337: 525-531, (1989); Harvill *et al.*, Immunotech., 1:95-105, (1995); el documento WO 97/23614, publicado el 3 de julio de 1997; el documento PCT/US 97/23183, presentado el 11 de diciembre de 1997; Linsley, J. Exp. Med., 174: 561-569, (1991); el documento WO 95/21258, publicado el 10 de agosto de 1995). El documento WO 0057901 da a conocer la disminución de la permeabilidad vascular mediante la administración de un anticuerpo neutralizante de Ang-2.

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

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

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes de unión específicos de Ang-2 que modulan la actividad de Ang-2.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones. La descripción proporciona un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en 526 HC (SEQ ID NO. 1); 528 HC (SEQ ID NO. 3); 531 HC (SEQ ID NO. 5); 533 HC (SEQ ID NO. 7); 535 HC (SEQ ID NO. 9); 536 HC (SEQ ID NO. 11); 537 HC (SEQ ID NO. 13); 540 HC (SEQ ID NO. 15); 543 HC (SEQ ID NO. 17); 544 HC (SEQ ID NO. 19); 545 HC (SEQ ID NO. 21); 546 HC (SEQ ID NO. 23); 551 HC (SEQ ID NO. 25); 553 HC (SEQ ID NO. 27); 555 HC (SEQ ID NO. 29); 558 HC (SEQ ID NO. 31); 559 HC (SEQ ID NO. 33); 565 HC (SEQ ID NO. 35); F1-C6 HC (SEQ ID NO. 37); FB1-A7 HC (SEQ ID NO. 39); FD-B2 HC (SEQ ID NO. 41); FE-B7 HC (SEQ ID NO. 43); FJ-G11 HC (SEQ ID NO. 45); FK-E3 HC (SEQ ID NO. 47); G1D4 HC (SEQ ID NO. 49); GC1E8 HC (SEQ ID NO. 51); H1C12 HC (SEQ ID NO. 53); IA1-IE7 HC (SEQ ID NO. 55); IF-1C10 HC (SEQ ID NO. 57); IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59); IP-2C11 HC (SEQ ID NO. 61); y fragmentos de unión a antígeno de los mismos; y dicha cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: 526 kappa (SEQ ID NO. 2); 536 kappa (SEQ ID NO. 12); 543 kappa (SEQ ID NO. 18); 544 kappa (SEQ ID NO. 20); 551 kappa (SEQ ID NO. 26); 553 kappa (SEQ ID NO. 28); 555 kappa (SEQ

ID NO. 30); 558 kappa (SEQ ID NO. 32); 565 kappa (SEQ ID NO. 36); FE-B7 kappa (SEQ ID NO. 44); FJ-G11 kappa (SEQ ID NO. 46); FK-E3 kappa (SEQ ID NO. 48); IA1-IE7 kappa (SEQ ID NO. 56); IP- 2C11 kappa (SEQ ID NO. 62); 528 lambda (SEQ ID NO. 4); 531 lambda (SEQ ID NO. 6); 533 lambda (SEQ ID NO. 8); 535 lambda (SEQ ID NO. 10); 537 lambda (SEQ ID NO. 14); 540 lambda (SEQ ID NO. 16); 545 lambda (SEQ ID NO. 22); 546 lambda (SEQ ID NO. 24); 559 lambda (SEQ ID NO. 34); F1-C6 lambda (SEQ ID NO. 38); FB1-A7 lambda (SEQ ID NO. 40); FD-B2 lambda (SEQ ID NO. 42); G1D4 lambda (SEQ ID NO. 50); GC1E8 lambda (SEQ ID NO. 52); H1C12 lambda (SEQ ID NO. 54); IF-1C10 lambda (SEQ ID NO. 58); IK-2E2 lambda (SEQ ID NO. 60); y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

La descripción proporciona además un agente de unión específico que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO. 3; SEQ ID NO. 5; SEQ ID NO. 7; SEQ ID NO. 9; SEQ ID NO. 11; SEQ ID NO. 13; SEQ ID NO. 15; SEQ ID NO. 17; SEQ ID NO. 19; SEQ ID NO. 21; SEQ ID NO. 23; SEQ ID NO. 25; SEQ ID NO. 27; SEQ ID NO. 29; SEQ ID NO. 31; SEQ ID NO. 33; SEQ ID NO. 35; SEQ ID NO. 37; SEQ ID NO. 39; SEQ ID NO. 41; SEQ ID NO. 43; SEQ ID NO. 45; SEQ ID NO. 47; SEQ ID NO. 49; SEQ ID NO. 51; SEQ ID NO. 53; SEQ ID NO. 55; SEQ ID NO. 57; SEQ ID NO. 59; SEQ ID NO. 61; SEQ ID NO. 2; SEQ ID NO. 12; SEQ ID NO. 18; SEQ ID NO. 20; SEQ ID NO. 26; SEQ ID NO. 28; SEQ ID NO. 30; SEQ ID NO. 32; SEQ ID NO. 36; SEQ ID NO. 44; SEQ ID NO. 46; SEQ ID NO. 48; SEQ ID NO. 56; SEQ ID NO. 62; SEQ ID NO. 4; SEQ ID NO. 6; SEQ ID NO. 8; SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 14; SEQ ID NO. 16; SEQ ID NO. 22; SEQ ID NO. 24; SEQ ID NO. 34; SEQ ID NO. 38; SEQ ID NO. 40; SEQ ID NO. 42; SEQ ID NO. 50; SEQ ID NO. 52; SEQ ID NO. 54; SEQ ID NO. 58 y SEQ ID NO. 60, y fragmentos de los mismos.

Se apreciará que el agente de unión específico puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado o completamente humano. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo de cadena sencilla. La descripción se refiere además a un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal según la invención.

Se apreciará además que la descripción se refiere a conjugados tal como se describe en el presente documento. El conjugado puede ser, por ejemplo, un agente de unión específico (tal como un anticuerpo) de la invención.

La invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican para los anticuerpos de la invención, así como a un vector que comprende tal molécula de ácido nucleico, así como a una célula huésped que contiene el vector.

Adicionalmente, la invención proporciona un método de preparación de un anticuerpo que comprende, (a) transformar una célula huésped con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo de la reivindicación 1; (b) expresar la molécula de ácido nucleico en dicha célula huésped; y (c) aislar dicho anticuerpo. La invención proporciona además un método de preparación de un anticuerpo que comprende: (a) transformar una célula huésped con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo según la invención; (b) expresar la molécula de ácido nucleico en dicha célula huésped; y (c) aislar dicho anticuerpo.

Además, la invención se refiere a los anticuerpos reivindicados para su uso en un método de inhibición de la angiogénesis no deseada en un mamífero administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención. La invención también proporciona los anticuerpos reivindicados para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención.

Se apreciará que la invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo según la invención y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica comprende un anticuerpo según la invención y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona los anticuerpos reivindicados para su uso en un método de modulación o inhibición de la actividad de angiotensina-2 administrando uno o más anticuerpos de la invención.

La invención se refiere además a los anticuerpos reivindicados para su uso en un método de modulación de al menos una de permeabilidad vascular o extravasación plasmática en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención. La invención también se refiere a los anticuerpos reivindicados para su uso en un método de tratamiento de al menos una de enfermedad neovascular ocular, hemangioblastoma, hemangioma, enfermedad inflamatoria, trastornos inflamatorios crónicos, endometriosis, enfermedad neoplásica, enfermedad relacionada con los huesos o psoriasis en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención.

Además, la invención se refiere a los anticuerpos reivindicados para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención y un agente quimioterápico. Los expertos apreciarán que no es necesario administrar simultáneamente el agente de unión específico y el agente quimioterápico.

La descripción se refiere además al tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención y un agente quimioterápico. No es necesario administrar simultáneamente el agente de unión específico y el agente quimioterápico.

5 La descripción se refiere además a un agente de unión específico que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR 1 de cualquiera de: 526 HC (SEQ ID NO. 1); 528 HC (SEQ ID NO. 3); 531 HC (SEQ ID NO. 5); 533 HC (SEQ ID NO. 7); 535 HC (SEQ ID NO. 9); 536 HC (SEQ ID NO. 11); 537 HC (SEQ ID NO. 13); 540 HC (SEQ ID NO. 15); 543 HC (SEQ ID NO. 17); 544 HC (SEQ ID NO. 19); 545 HC (SEQ ID NO. 21); 546 HC (SEQ ID NO. 23); 551 HC (SEQ ID NO. 25); 553 HC (SEQ ID NO. 27); 555 HC (SEQ ID NO. 29); 558 HC (SEQ ID NO. 31); 559 HC (SEQ ID NO. 33); 565 HC (SEQ ID NO. 35); F1-C6 HC (SEQ ID NO. 37); FB1-A7 HC (SEQ ID NO. 39); FD-B2 HC (SEQ ID NO. 41); FE-B7 HC (SEQ ID NO. 43); FJ-G11 HC (SEQ ID NO. 45); FK-E3 HC (SEQ ID NO. 47); G1D4 HC (SEQ ID NO. 49); GC1E8 HC (SEQ ID NO. 51); H1C12 HC (SEQ ID NO. 53); IA1-IE7 HC (SEQ ID NO. 55); IF-1C10 HC (SEQ ID NO. 57); IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59); IP-2C11 HC (SEQ ID NO. 61); 526 kappa (SEQ ID NO. 2); 536 kappa (SEQ ID NO. 12); 543 kappa (SEQ ID NO. 18); 544 kappa (SEQ ID NO. 20); 551 kappa (SEQ ID NO. 26); 553 kappa (SEQ ID NO. 28); 555 kappa (SEQ ID NO. 30); 558 kappa (SEQ ID NO. 32); 565 kappa (SEQ ID NO. 36); FE-B7 kappa (SEQ ID NO. 44); FJ-G11 kappa (SEQ ID NO. 46); FK-E3 kappa (SEQ ID NO. 48); IA1-IE7 kappa (SEQ ID NO. 56); IP-2C11 kappa (SEQ ID NO. 62); 528 lambda (SEQ ID NO. 4); 531 lambda (SEQ ID NO. 6); 533 lambda (SEQ ID NO. 8); 535 lambda (SEQ ID NO. 10); 537 lambda (SEQ ID NO. 14); 540 lambda (SEQ ID NO. 16); 545 lambda (SEQ ID NO. 22); 546 lambda (SEQ ID NO. 24); 559 lambda (SEQ ID NO. 34); F1-C6 lambda (SEQ ID NO. 38); FB1-A7 lambda (SEQ ID NO. 40); FD-B2 lambda (SEQ ID NO. 42); G1D4 lambda (SEQ ID NO. 50); GC1E8 lambda (SEQ ID NO. 52); H1C12 lambda (SEQ ID NO. 54); IF-1C10 lambda (SEQ ID NO. 58); e IK-2E2 lambda (SEQ ID NO. 60).

La descripción se refiere además a un agente de unión específico que comprende una región determinante de complementariedad 2 (CDR 2 de cualquiera de: 526 HC (SEQ ID NO. 1); 528 HC (SEQ ID NO. 3); 531 HC (SEQ ID NO. 5); 533 HC (SEQ ID NO. 7); 535 HC (SEQ ID NO. 9); 536 HC (SEQ ID NO. 11); 537 HC (SEQ ID NO. 13); 540 HC (SEQ ID NO. 15); 543 HC (SEQ ID NO. 17); 544 HC (SEQ ID NO. 19); 545 HC (SEQ ID NO. 21); 546 HC (SEQ ID NO. 23); 551 HC (SEQ ID NO. 25); 553 HC (SEQ ID NO. 27); 555 HC (SEQ ID NO. 29); 558 HC (SEQ ID NO. 31); 559 HC (SEQ ID NO. 33); 565 HC (SEQ ID NO. 35); F1-C6 HC (SEQ ID NO. 37); FB1-A7 HC (SEQ ID NO. 39); FD-B2 HC (SEQ ID NO. 41); FE-B7 HC (SEQ ID NO. 43); FJ-G11 HC (SEQ ID NO. 45); FK-E3 HC (SEQ ID NO. 47); G1D4 HC (SEQ ID NO. 49); GC1E8 HC (SEQ ID NO. 51); H1C12 HC (SEQ ID NO. 53); IA1-IE7 HC (SEQ ID NO. 55); IF-1C10 HC (SEQ ID NO. 57); IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59); IP-2C11 HC (SEQ ID NO. 61); 526 kappa (SEQ ID NO. 2); 536 kappa (SEQ ID NO. 12); 543 kappa (SEQ ID NO. 18); 544 kappa (SEQ ID NO. 20); 551 kappa (SEQ ID NO. 26); 553 kappa (SEQ ID NO. 28); 555 kappa (SEQ ID NO. 30); 558 kappa (SEQ ID NO. 32); 565 kappa (SEQ ID NO. 36); FE-B7 kappa (SEQ ID NO. 44); FJ-G11 kappa (SEQ ID NO. 46); FK-E3 kappa (SEQ ID NO. 48); IA1-IE7 kappa (SEQ ID NO. 56); IP-2C11 kappa (SEQ ID NO. 62); 528 lambda (SEQ ID NO. 4); 531 lambda (SEQ ID NO. 6); 533 lambda (SEQ ID NO. 8); 535 lambda (SEQ ID NO. 10); 537 lambda (SEQ ID NO. 14); 540 lambda (SEQ ID NO. 16); 545 lambda (SEQ ID NO. 22); 546 lambda (SEQ ID NO. 24); 559 lambda (SEQ ID NO. 34); F1-C6 lambda (SEQ ID NO. 38); FB1-A7 lambda (SEQ ID NO. 40); FD-B2 lambda (SEQ ID NO. 42); G1D4 lambda (SEQ ID NO. 50); GC1E8 lambda (SEQ ID NO. 52); H1C12 lambda (SEQ ID NO. 54); IF-1C10 lambda (SEQ ID NO. 58); e IK-2E2 lambda (SEQ ID NO. 60).

40 La descripción se refiere además a un agente de unión específico que comprende una región determinante de complementariedad 3 (CDR 3) de cualquiera de: 526 HC (SEQ ID NO. 1); 528 HC (SEQ ID NO. 3); 531 HC (SEQ ID NO. 5); 533 HC (SEQ ID NO. 7); 535 HC (SEQ ID NO. 9); 536 HC (SEQ ID NO. 11); 537 HC (SEQ ID NO. 13); 540 HC (SEQ ID NO. 15); 543 HC (SEQ ID NO. 17); 544 HC (SEQ ID NO. 19); 545 HC (SEQ ID NO. 21); 546 HC (SEQ ID NO. 23); 551 HC (SEQ ID NO. 25); 553 HC (SEQ ID NO. 27); 555 HC (SEQ ID NO. 29); 558 HC (SEQ ID NO. 31); 559 HC (SEQ ID NO. 33); 565 HC (SEQ ID NO. 35); F1-C6 HC (SEQ ID NO. 37); FB1-A7 HC (SEQ ID NO. 39); FD-B2 HC (SEQ ID NO. 41); FE-B7 HC (SEQ ID NO. 43); FJ-G11 HC (SEQ ID NO. 45); FK-E3 HC (SEQ ID NO. 47); G1D4 HC (SEQ ID NO. 49); GC1E8 HC (SEQ ID NO. 51); H1C12 HC (SEQ ID NO. 53); IA1-IE7 HC (SEQ ID NO. 55); IF-1C10 HC (SEQ ID NO. 57); IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59); IP-2C11 HC (SEQ ID NO. 61); 526 kappa (SEQ ID NO. 2); 536 kappa (SEQ ID NO. 12); 543 kappa (SEQ ID NO. 18); 544 kappa (SEQ ID NO. 20); 551 kappa (SEQ ID NO. 26); 553 kappa (SEQ ID NO. 28); 555 kappa (SEQ ID NO. 30); 558 kappa (SEQ ID NO. 32); 565 kappa (SEQ ID NO. 36); FE-B7 kappa (SEQ ID NO. 44); FJ-G11 kappa (SEQ ID NO. 46); FK-E3 kappa (SEQ ID NO. 48); IA1-IE7 kappa (SEQ ID NO. 56); IP-2C11 kappa (SEQ ID NO. 62); 528 lambda (SEQ ID NO. 4); 531 lambda (SEQ ID NO. 6); 533 lambda (SEQ ID NO. 8); 535 lambda (SEQ ID NO. 10); 537 lambda (SEQ ID NO. 14); 540 lambda (SEQ ID NO. 16); 545 lambda (SEQ ID NO. 22); 546 lambda (SEQ ID NO. 24); 559 lambda (SEQ ID NO. 34); F1-C6 lambda (SEQ ID NO. 38); FB1-A7 lambda (SEQ ID NO. 40); FD-B2 lambda (SEQ ID NO. 42); G1D4 lambda (SEQ ID NO. 50); GC1E8 lambda (SEQ ID NO. 52); H1C12 lambda (SEQ ID NO. 54); IF-1C10 lambda (SEQ ID NO. 58) e IK-2E2 lambda (SEQ ID NO. 60).

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo según la invención.

60 Además, la descripción se refiere a un método de detección del nivel de angiopoyetina-2 en una muestra biológica mediante (a) poniendo en contacto un agente de unión específico de la invención con la muestra; y (b) determinando el grado de unión del agente de unión específico a la muestra. La descripción también se refiere a un método de

detección del nivel de angiopoyetina-2 en una muestra biológica (a) poniendo en contacto un anticuerpo de la invención con la muestra y (b) determinando el grado de unión del anticuerpo a la muestra.

La descripción también se refiere a un método de inhibición de la angiogénesis no deseada en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o una composición tal como se describe en el presente documento. La descripción también se refiere a un método de modulación de la angiogénesis en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o una composición tal como se describe en el presente documento. La descripción se refiere además a un método de inhibición del crecimiento tumoral caracterizado por angiogénesis no deseada en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o una composición tal como se describe en el presente documento. Adicionalmente, la descripción se refiere a un método de tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o una composición tal como se describe en el presente documento y un agente quimioterápico. En una realización preferida, el agente quimioterápico es al menos uno de 5-FU, CPT-11 y Taxotere. Se apreciará, sin embargo, que pueden usarse otros agentes quimioterápicos adecuados y otras terapias contra el cáncer.

Se apreciará que los agentes de unión específicos de la invención pueden usarse para tratar varias enfermedades asociadas a angiogénesis no regulada o no deseada. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, neovascularización ocular, tales como retinopatías (incluyendo retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad), psoriasis, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, tal como enfermedad inflamatoria reumatoide o reumática, especialmente artritis (incluyendo artritis reumatoide) u otros trastornos inflamatorios crónicos, tales como asma crónica, aterosclerosis arterial o posterior a trasplante, endometriosis y enfermedades neoplásicas, por ejemplo los denominados tumores sólidos y tumores líquidos (tales como leucemias). Resultarán evidentes para los expertos en la técnica enfermedades adicionales que pueden tratarse mediante la administración de los agentes de unión específicos. Tales enfermedades adicionales incluyen, pero no se limitan a, obesidad, permeabilidad vascular, extravasación plasmática y trastornos relacionados con los huesos, incluyendo osteoporosis. Por tanto, la invención se refiere además a métodos de tratamiento de estas enfermedades asociadas a angiogénesis no regulada o no deseada.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa un gráfico del tamaño tumoral (eje y) frente al tiempo (eje x) en ratones que llevan tumor tratados con o bien un anticuerpo anti-Ang-2 (clone 533, 537 o 544) de la invención, con un anticuerpo control, o bien con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se describen detalles en los ejemplos.

Las figuras 2A, 2B y 2C representan datos de mapeo de epítomos (D.O. 370) para Ang-2 humana de longitud completa (hAng-2), en el extremo N de hAng-2 y el extremo C de hAng-2, respectivamente, para los peptidocuerpos TN8-Con4-C, L1-7-N y 12-9-3-C según la invención, así como para el peptidocuerpo control, Tie2-Fc, C2B8 o 5B12. Se describen detalles en los ejemplos.

Descripción detallada de la invención

Los encabezamientos de las secciones se usan en el presente documento para fines de organización solamente, y no deben interpretarse de ninguna manera limitativos del contenido descrito.

Pueden usarse técnicas convencionales para la producción de moléculas de ADN recombinante, proteínas y anticuerpos, así como para el cultivo de tejidos y transformación celular. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan normalmente según las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica usando procedimientos convencionales tales como los expuestos en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989]), o tal como se describe en el presente documento. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

Definiciones

Tal como se utiliza según la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, debe entenderse que tienen los siguientes significados:

El término "Ang-2" se refiere al polipéptido expuesto en la figura 6 de la patente estadounidense n.º 6.166.185 ("ligando-2 Tie-2") o fragmentos del mismo así como a polipéptidos relacionados que incluyen variantes alélicas, variantes de corte y empalme, derivados, variantes de sustitución, deleciones y/o inserción, péptidos y polipéptidos de fusión y homólogos interespecie. El polipéptido Ang-2 puede incluir o no residuos terminales adicionales, por ejemplo, secuencias líder, secuencias de direccionamiento, metionina amino terminal, residuos de metionina y lisina amino terminales y/o secuencias de etiqueta o proteínas de fusión, dependiendo de la manera en la que se prepara.

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

5 El término “agente de unión específico” se refiere a una molécula, preferiblemente una molécula proteínica que se une a Ang-2 (y variantes y derivados de la misma tal como se define en el presente documento) con una afinidad mayor que otras angiopoyetinas. Un agente de unión específico puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido o compuesto de peso molecular pequeño que se une preferentemente a Ang-2. En una
10 realización preferida, el agente de unión específico según la presente invención es un anticuerpo, tal como un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal (AcM), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo catalítico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) y anticuerpos que pueden marcarse en forma soluble o unida, así como fragmentos, variantes o derivados de los mismos, o bien solos o bien en combinación con otras
15 secuencias de aminoácidos, proporcionadas mediante técnicas conocidas. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a escisión enzimática, escisión química, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes. Los agentes de unión específicos anti-Ang-2 de la presente invención pueden unirse a partes de Ang-2 que modulan, por ejemplo, inhiben o promueven, la actividad biológica de Ang-2 y/u otras actividades asociadas a Ang-2.

El término “anticuerpo policlonal” se refiere a una mezcla heterogénea de anticuerpos que reconocen y se unen a diferentes epítomos en el mismo antígeno. Pueden obtenerse anticuerpos policlonales a partir de preparaciones de
20 suero brutas o pueden purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de afinidad de antígeno, o cromatografía de afinidad de proteína A/proteína G.

El término “anticuerpos monoclonales” se refiere a una colección de anticuerpos codificados por la misma molécula de ácido nucleico que se producen opcionalmente por un único hibridoma u otra línea celular o por un mamífero transgénico de manera que cada anticuerpo monoclonal reconocerá normalmente el mismo epítomo en el antígeno.
25 El término “monoclonal” no se limita a ningún método particular para preparar el anticuerpo, ni se limita el término a anticuerpos producidos en una especie particular, por ejemplo, ratón, rata, etc.

El término “anticuerpos quiméricos” se refiere a anticuerpos en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente en un anticuerpo derivado de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son
30 idéntica(s) u homóloga(s) a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo. Se incluyen también fragmentos de tales anticuerpos, que presentan la actividad biológica deseada (es decir, la capacidad para unirse específicamente a Ang-2). Véase la patente estadounidense n.º 4.816.567 y Morrison *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA), 81: 6851-6855 [1985].

El término “anticuerpo injertado con CDR” se refiere a un anticuerpo en el que la CDR de un anticuerpo de una especie o isotipo particular se inserta de manera recombinante en la región de entramado de otro anticuerpo de la
35 misma o diferente especie o isotipo.

El término “anticuerpo multiespecífico” se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables que reconocen más de un epítomo en uno o más antígenos. Una subclase de este tipo de anticuerpo es un “anticuerpo biespecífico” que reconoce dos epítomos distintos en los mismos o diferentes antígenos.

40 Anticuerpos “catalíticos” se refiere a anticuerpos en los que uno o más restos citotóxicos, o más generalmente uno o más restos biológicamente activos, se unen al agente de unión de direccionamiento.

El término “anticuerpo humanizado” se refiere a un tipo específico de anticuerpo injertado con CDR en el que la región de entramado del anticuerpo se deriva de un ser humano pero cada CDR se reemplaza con la derivada de otra especie, tal como una CDR murina. El término “CDR” se define más adelante.

45 El término anticuerpo “completamente humano” se refiere a un anticuerpo en el que tanto la CDR como el entramado se derivan de una o más moléculas de ADN humano.

El término anticuerpo “anti-idiotipo” se refiere a cualquier anticuerpo que se une específicamente a otro anticuerpo que reconoce un antígeno. La producción de anticuerpos anti-idiotipo puede realizarse por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para la producción de anticuerpos específicos de Ang-2 excepto
50 porque estos anticuerpos se generan a partir de, por ejemplo, la inmunización de un animal con un anticuerpo específico de Ang-2 o un fragmento de unión a Ang-2 del mismo, en lugar del propio polipéptido Ang-2 o un fragmento del mismo.

El término “variantes” tal como se usa en el presente documento, incluye aquellos polipéptidos en los que los residuos de aminoácido se insertan en, se delecionan de y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos que se produce de manera natural (o al menos una conocida) para el agente de unión. Las variantes de la invención
55 incluyen proteínas de fusión tal como se describe a continuación.

Los “derivados” incluyen los agentes de unión que se han modificado químicamente de alguna manera distinta de variantes de inserción, delección o sustitución.

5 “Se une específicamente a Ang-2” se refiere a la capacidad de un agente de unión específico (tal como un anticuerpo o fragmento del mismo) de la presente invención para reconocer y unirse al polipéptido Ang-2 humano, de longitud completa o longitud parcial, maduro, o un ortólogo del mismo, de manera que su afinidad (tal como se determina mediante, por ejemplo, ensayos ELISA de afinidad o BIAcore tal como se describe en el presente documento) o su capacidad de neutralización (tal como se determina mediante, por ejemplo, ensayos ELISA de Neutralización descritos en el presente documento o ensayos similares) es al menos 10 veces mayor, pero opcionalmente 50 veces mayor, 100, 250 ó 500 veces mayor, o incluso al menos 1000 veces mayor que la afinidad o capacidad de neutralización de la misma para cualquier otra angiopoyetina u otro péptido o polipéptido.

15 El término “dominio de unión a antígeno” o “región de unión a antígeno” se refiere a la parte del agente de unión específico (tal como una molécula de anticuerpo) que contiene los residuos de aminoácido del agente de unión específico (u otros restos) que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y afinidad por el antígeno. En un anticuerpo, el dominio de unión a antígeno se denomina comúnmente “región determinante de complementariedad, o CDR.”

20 El término “epítipo” se refiere a la parte de cualquier molécula que puede reconocerse por y a la que se une un agente de unión específico, por ejemplo un anticuerpo, en una o más de las regiones de unión a antígeno de los agentes de unión. Los epítipos consisten habitualmente en agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activas, tales como por ejemplo, aminoácidos o cadenas laterales de hidratos de carbono, y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Los epítipos tal como se usan en el presente documento pueden ser contiguos o no contiguos. Además, los epítipos pueden ser miméticos ya que comprenden una estructura tridimensional que es idéntica al epítipo usado para generar el anticuerpo, comprende aún ninguno o solo algunos de los residuos de aminoácido encontrados en la Ang-2 usada para estimular la respuesta inmunitaria del anticuerpo.

25 El término “epítipo inhibidor y/o neutralizante” es un epítipo que, cuando se le une un agente de unión específico tal como un anticuerpo, da como resultado la pérdida de (o al menos la disminución en) la actividad biológica de la molécula, célula u organismo que contiene tal epítipo, *in vivo*, *in vitro* o *in situ*. En el contexto de la presente invención, el epítipo neutralizante se localiza en o está asociado a una región biológicamente activa de Ang-2. Alternativamente, el término “epítipo activante” es un epítipo que, cuando se le une un agente de unión específico de la invención, tal como un anticuerpo, da como resultado la activación, o al menos el mantenimiento de una conformación biológicamente activa de Ang-2.

35 El término “fragmento de anticuerpo” se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de un anticuerpo completo, intacto. Los anticuerpos completos comprenden dos partes o fragmentos funcionalmente independientes: un fragmento de unión a antígeno conocido como “Fab” y un fragmento cristalizante carboxilo terminal conocido como fragmento “Fc”. El fragmento Fab incluye el primer dominio constante de tanto la cadena pesada como la cadena ligera (CH1 y CL1) junto con las regiones variables de tanto la cadena pesada como la cadena ligera que se unen al antígeno específico. Cada una de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera incluye tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) y residuos de aminoácido de entramado que separan las CDR individuales. La región Fc comprende las regiones constantes de cadena pesada segunda y tercera (CH2 y CH3) y está implicada en funciones efectoras tales como activación del complemento y ataque por células fagocíticas. En algunos anticuerpos, las regiones Fc y Fab están separadas por una “región bisagra” de anticuerpo, y dependiendo de cómo el anticuerpo de longitud completa se escinde de manera proteolítica, la región bisagra puede estar asociada a o bien el fragmento Fab o bien el fragmento Fc. Por ejemplo, la escisión de un anticuerpo con la proteasa papaína da como resultado que la región bisagra se asocia al fragmento Fc resultante, mientras que la escisión con la proteasa pepsina proporciona un fragmento en el que la bisagra se asocia a ambos fragmentos Fab simultáneamente. Debido a que los dos fragmentos Fab están de hecho unidos covalentemente tras la escisión con pepsina, el fragmento resultante se denomina fragmento F(ab')₂.

50 Un dominio Fc puede tener una vida media sérica relativamente larga, mientras que un Fab es de vida corta. [Capon *et al.*, Nature, 337: 525-31 (1989)]. Cuando se expresa como parte de una proteína de fusión, un dominio de Fc puede conferir vida media más larga o incorporar funciones tales como unión a receptor de Fc, unión a proteína A, fijación del complemento y quizás incluso transferencia placentaria a la proteína a la que se fusiona. La región Fc puede ser una región Fc que se produce de manera natural o puede alterarse para mejorar determinadas cualidades, tales como cualidades terapéuticas o tiempo de circulación.

55 El término “región variable” o “dominio variable” se refiere a una parte de las cadenas ligera y/o pesada de un anticuerpo, normalmente incluyendo aproximadamente los 120 a 130 aminoácidos amino terminales en la cadena pesada y aproximadamente 100 a 110 aminoácidos amino terminales en la cadena ligera. Normalmente, las regiones variables difieren ampliamente en la secuencia de aminoácidos incluso entre anticuerpos de la misma especie. La región variable de un anticuerpo determina normalmente la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en aquellas regiones denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), mientras que las regiones más altamente conservadas en el

dominio variable se denominan regiones de entramado (FR). Las CDR de las cadenas ligera y pesada contienen dentro de las mismas los aminoácidos que son responsables en gran parte de la interacción directa del anticuerpo con el antígeno, sin embargo, los aminoácidos en las FR pueden afectar significativamente a la unión/reconocimiento del antígeno tal como se trata en el presente documento más adelante.

- 5 El término “cadena ligera” cuando se usa en referencia a un anticuerpo se refiere colectivamente a dos tipos distintos, denominados kappa (k) o lambda (l) basándose en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes.

10 El término “cadena pesada” cuando se usa en referencia a un anticuerpo se refiere colectivamente a cinco tipos distintos, denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, basándose en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada. La combinación de cadenas pesada y ligera da lugar a cinco clases conocidas de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases conocidas de IgG, designadas como IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

15 La expresión “que se produce de manera natural” cuando se usa en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped y similares, se refiere a los que se encuentran en la naturaleza y no están modificados por un ser humano.

El término “aislado” cuando se usa en relación con Ang-2 o con un agente de unión específico de Ang-2 se refiere a un compuesto que está libre de al menos un polipéptido o compuesto contaminante que se encuentra en su entorno natural y preferiblemente libre sustancialmente de cualquier otro polipéptido de mamífero contaminante que interferiría con su uso terapéutico o diagnóstico.

- 20 El término “maduro” cuando se usa en relación con Ang-2, anticuerpo anti-Ang-2, o con cualquier otro agente de unión específico proteínico de Ang-2 se refiere a un péptido o un polipéptido que carece de una secuencia líder o señal. Cuando se expresa un agente de unión de la invención, por ejemplo, en una célula huésped procarionta, el péptido o polipéptido “maduro” puede incluir también residuos de aminoácido adicionales (pero todavía carecer de una secuencia líder) tal como una metionina amino terminal o uno o más residuos de metionina y lisina. Un péptido o polipéptido producido de esta manera puede utilizarse con o sin estos residuos de aminoácido adicionales que se han eliminado.

25 Los términos “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” cuando se usan en relación con un agente de unión específico de Ang-2 se refiere a una cantidad de un agente de unión específico que es útil o necesaria para mantener un cambio observable en el nivel de una o más actividades biológicas de Ang-2. El cambio puede ser o bien un aumento o bien una disminución en el nivel de actividad de Ang-2. Preferiblemente, el cambio es una disminución en la actividad de Ang-2.

Agentes de unión específicos y anticuerpos

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “agente de unión específico” se refiere a una molécula que tiene especificidad para reconocer y unirse a Ang-2 tal como se describe en el presente documento. Los agentes de unión específicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y derivados de los mismos, polipéptidos y moléculas pequeñas. Pueden prepararse agentes de unión específicos adecuados usando métodos conocidos en la técnica. Un agente de unión específico de polipéptido de Ang-2 a modo de ejemplo de la presente descripción puede unirse a una determinada parte del polipéptido de Ang-2 y modular preferiblemente la actividad o función del polipéptido de Ang-2.

40 Anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a polipéptidos de Ang-2 están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser policlonales incluyendo policlonales mono-específicos, monoclonales (AcM), recombinantes, quiméricos, humanizados tales como injertados con CDR, humanos, de cadena sencilla, catalíticos, multiespecíficos y/o biespecíficos, así como fragmentos, variantes y/o derivados de los mismos.

45 Los anticuerpos policlonales dirigidos hacia un polipéptido de Ang-2 se producen generalmente en animales (por ejemplo, conejos, hámsteres, cabras, ovejas, caballos, cerdos, ratas, jerbos, cobayas, ratones o cualquier otro mamífero adecuado, así como otras especies no mamíferas) por medio de múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de polipéptido de Ang-2 o un fragmento del mismo con o sin un adyuvante. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante completo e incompleto de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. BCG (bacilos Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son adyuvantes humanos potencialmente útiles. Puede ser útil conjugar un polipéptido de antígeno con una proteína portadora que es inmunogénica en la especie que va a inmunizarse, tal como hemocianina de lapa californiana, suero, albúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja. Además, se usan agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria. Tras la inmunización, los animales son sangrados y se somete a ensayo el suero para determinar el título de anticuerpos anti-polipéptido de Ang-2 que puede determinarse usando los ensayos descritos en el presente documento en “Ejemplos”. Pueden utilizarse anticuerpos policlonales en los sueros a partir de los que se detectaron o pueden purificarse a partir de los sueros, usando, por ejemplo,

cromatografía de afinidad de antígeno o cromatografía de afinidad de proteína A o G.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales dirigidos hacia los polipéptidos de Ang-2 usando, por ejemplo pero sin limitación, el método del "hibridoma" tradicional o la técnica de "presentación en fago" más nueva. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales de la invención mediante el método del hibridoma tal como se describe en Kohler *et al.*, Nature 256: 495 [1975]; la técnica del hibridoma de células B humanas [Kosbor *et al.*, Immunol Today 4: 72 (1983); Cote *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA) 80: 2026-2030 (1983); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987)] y la técnica de hibridoma de VEB [Cole *et al.*, Monoclonales Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, Nueva York N. Y., págs 77-96, (1985)]. La invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con polipéptidos de Ang-2.

Cuando se emplea la técnica del hibridoma, pueden usarse líneas celulares de mieloma. Tales líneas celulares adecuadas para su uso en procedimientos de fusión de producción de hibridomas son preferiblemente no productoras de anticuerpos, tienen alta eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de crecer en determinados medios selectivos que mantienen el crecimiento de sólo las células fusionadas deseadas (hibridomas). Por ejemplo, líneas celulares usadas en fusiones de ratón son Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XXO Bul; líneas celulares usadas en fusiones de rata son R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para fusiones celulares son U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6. Se contempla que hibridomas y otras líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales sean composiciones novedosas de la presente invención.

La técnica de presentación en fago también puede usarse para generar anticuerpos monoclonales de cualquier especie. Preferiblemente, esta técnica se usa para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos en los que se expresa un polinucleótido que codifica para un único Fab o fragmento de anticuerpo Fv en la superficie de una partícula de fago. [Hoogenboom *et al.*, J Mol Biol 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J Mol Biol 222: 581 (1991); véase también la patente estadounidense n.º 5.885.793]. Cada fago puede "seleccionarse" usando ensayos de unión descritos en el presente documento para identificar los fragmentos de anticuerpo que tienen afinidad por Ang-2. Por tanto, estos procesos imitan la selección inmunitaria a través de la presentación de repertorios de fragmentos de anticuerpo en la superficie de un bacteriófago filamentoso y la selección posterior del fago mediante su unión a Ang-2. Un procedimiento de este tipo se describe en la solicitud PCT n.º PCT/US98/17364, presentada a nombre de Adams *et al.*, que describe el aislamiento de fragmentos de anticuerpo de alta afinidad y agonísticos funcionales para receptores de MPL y msk usando un enfoque de este tipo. En este enfoque, puede crearse un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos clonando de manera natural genes V humanos reorganizados de linfocitos de sangre periférica tal como se describió previamente [Mullinax *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA) 87: 8095-8099 (1990)].

Una vez que se identifican secuencias de polinucleótido que codifican para cada cadena del anticuerpo monoclonal de longitud completa o el(los) fragmento(s) Fab o Fv de la invención, pueden usarse célula huésped, o bien eucariotas o bien procariotas, para expresar los polinucleótidos de anticuerpo monoclonal usando técnicas recombinantes bien conocidas y puestas en práctica de manera rutinaria en la técnica. Alternativamente, se producen animales transgénicos en los que se introduce un polinucleótido que codifica para el agente de unión específico deseado en el genoma de un animal receptor, tal como, por ejemplo, un ratón, conejo, cabra o vaca, de una manera que permite la expresión de las moléculas de polinucleótido que codifican para un anticuerpo monoclonal u otro agente de unión específico. En un aspecto, los polinucleótidos que codifican para el anticuerpo monoclonal u otro agente de unión específico pueden ligarse a secuencias reguladoras específicas de mama y los polinucleótidos quiméricos pueden introducirse en la línea germinal del animal diana. Entonces, el animal transgénico resultante produce el anticuerpo deseado en su leche [Pollock *et al.*, J Immunol Meth 231: 147-157 (1999); Little *et al.*, Immunol Today 8: 364-370 (2000)]. Además, pueden usarse plantas para expresar y producir agentes de unión específicos de Ang-2 tales como anticuerpos monoclonales mediante la transfección de plantas adecuadas con los polinucleótidos que codifican para los anticuerpos monoclonales u otros agentes de unión específicos.

En otra realización de la presente invención, un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento del mismo que se deriva de una especie distinta a la humana puede estar "humanizado" o "quimerizado". Se conocen bien en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.859.205, 5.585.089 y 5.693.762). La humanización se realiza, por ejemplo, usando métodos descritos en la técnica [Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239: 1534-1536 (1988)] sustituyendo al menos una parte de, por ejemplo una región determinante de complementariedad (CDR) de roedor por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano. La invención también proporciona variantes y derivados de estos anticuerpos humanos tal como se trata en el presente documento y se conoce bien en la técnica.

La invención también abarca anticuerpos completamente humanos que se unen a polipéptidos de Ang-2, así como fragmentos, variantes y/o derivados de los mismos. Tales anticuerpos pueden producirse usando la técnica de presentación en fago descrita anteriormente. Alternativamente, pueden usarse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de

inmunoglobulina endógena para generar tales anticuerpos. Esto puede lograrse mediante la inmunización del animal con un antígeno de Ang-2 o fragmentos del mismo en el que los fragmentos de Ang-2 tienen una secuencia de aminoácidos que es única para Ang-2. Tales inmunógenos pueden conjugarse opcionalmente con un portador. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA), 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno, 7: 33 (1993). En un método, tales animales transgénicos se producen incapacitando los loci endógenos que codifican para las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera en los mismos, e insertando los que codifican para las proteínas de cadena pesada y ligera humanas en el genoma de los mismos. Entonces se cruzan los animales parcialmente modificados, que son aquellos que tienen menos que el complemento completo de estas modificaciones, para obtener un animal que tiene todas las modificaciones del sistema inmunitario deseadas. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos pueden producir anticuerpos con regiones variables humanas, incluyendo secuencias de aminoácidos humanas (en lugar de, por ejemplo, murinas), que son inmunoespecíficas para los antígenos deseados. Véanse las solicitudes PCT n.ºs PCT/US96/05928 y PCT/US93/06926. Se describen métodos adicionales en la patente estadounidense n.º 5.545.807, las solicitudes PCT n.ºs PCT/US91/245, PCT/GB89/01207 y en el documento EP 546073B1 y EP 546073A1. También pueden producirse anticuerpos humanos mediante la expresión de ADN recombinante en células huésped o mediante la expresión en células de hibridoma tal como se describe en el presente documento.

La transgénesis se logra de varias maneras diferentes. Véase, por ejemplo, Bruggeman *et al.*, Immunol Today 17: 391-7 (1996). En un enfoque, se construye un minilocus de manera que los segmentos del gen en una configuración de línea germinal se acercan artificialmente entre sí. Debido a limitaciones de tamaño (es decir, al tener generalmente menos de 30 kb), el minilocus resultante contendrá un número limitado de segmentos génicos diferentes, pero todavía puede producir un gran repertorio de anticuerpos. Los minilocus que contienen sólo secuencias de ADN humano, incluyendo promotores y potenciadores son completamente funcionales en el ratón transgénico.

Cuando se desea un gran número de segmentos génicos en el animal transgénico, se utilizan cromosomas artificiales de levadura (YAC). Los YAC pueden oscilar desde varios cientos de kilobases hasta 1 Mb y se introducen en el genoma del ratón (u otro animal apropiado) mediante microinyección directamente en un huevo o mediante transferencia de los YAC a líneas de células madre embrionarias (ES). En general, los YAC se transfieren a células ES mediante lipofección del ADN purificado o fusión de esferoplastos de levadura en la que el ADN purificado se porta en micelas y la fusión se lleva a cabo de manera similar a protocolos de fusión de hibridomas. La selección de células ES deseadas tras la transferencia de ADN se logra incluyendo en los YAC cualquiera de los marcadores seleccionables conocidos en la técnica.

Como otra alternativa, se usan los vectores de bacteriófago P1 que se amplifican en un huésped *E. coli* bacteriano. Aunque estos vectores portan generalmente menos ADN insertado que un YAC, los clones se hacen crecer fácilmente en rendimiento suficientemente alto como para permitir la microinyección directa a un huevo de ratón. Se ha mostrado que el uso de un cóctel de diferentes vectores de P1 conduce a niveles altos de recombinación homóloga.

Una vez que se ha identificado un ratón transgénico apropiado (u otro animal apropiado), usando cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para detectar niveles en suero de un anticuerpo circulante (por ejemplo, ELISA), el animal transgénico se cruza con un ratón en el que se ha alterado el locus de Ig endógeno. El resultado proporciona progenie en la que esencialmente todas las células B expresan anticuerpos humanos.

Como todavía otra alternativa, se reemplaza todo el locus de Ig del animal por el locus de Ig humano, en el que el animal resultante expresa sólo anticuerpos humanos. En otro enfoque, se reemplazan partes del locus del animal por regiones específicas y correspondientes en el locus humano. En determinados casos, los animales resultantes de este procedimiento pueden expresar anticuerpos quiméricos, en contraposición a anticuerpos completamente humanos, dependiendo de la naturaleza del reemplazo en el locus de Ig de ratón.

También pueden producirse anticuerpos humanos exponiendo esplenocitos humanos (células B o T) a un antígeno *in vitro*, reconstituyendo luego las células expuestas en un ratón inmunocomprometido, por ejemplo SCID o nod/SCID. Véanse Brams *et al.*, J Immunol, 160: 2051-2058 [1998]; Carballido *et al.*, Nat Med, 6: 103-106 [2000]. En un enfoque, el injerto de tejido fetal humano en ratones SCID (SCID-hu) da como resultado hematopoyesis a largo plazo y desarrollo de células T humanas [McCune *et al.*, Science 241: 1532-1639 (1988); Iversen *et al.*, Sem Immunol 8: 243-248 (1996)]. Cualquier respuesta inmunitaria humoral en estos ratones quiméricos es completamente dependiente del desarrollo de células T en los animales [Martensson *et al.*, Immunol 83: 1271-179 (1994)]. En un enfoque alternativo, se trasplantan linfocitos de sangre periférica humana por vía intraperitoneal (o de otra manera) en ratones SCID [Mosier *et al.*, Nature 335: 256-259 (1988)]. Cuando las células trasplantadas se tratan con o bien un agente de sensibilización, tal como enterotoxina A estafilocócica (SEA) [Martensson *et al.*, Immunol 84: 224-230 (1995)], o bien anticuerpos monoclonales anti-CD40 humano [Murphy *et al.*, Blood 86: 1946-1953 (1995)], se detectan niveles superiores de producción de células B.

Alternativamente, se crea un repertorio de cadenas pesadas humanas completamente sintéticas a partir de segmentos de gen V no reorganizados ensamblando cada segmento VH humano con segmentos D de nucleótidos aleatorios junto con un segmento J humano [Hoogenboom *et al.*, J Mol Biol 227: 381-388 (1992)]. Asimismo, se

construye un repertorio de cadenas ligeras combinando cada segmento V humano con un segmento J [Griffiths *et al.*, EMBO J 13: 3245-3260 (1994)]. Los nucleótidos que codifican para el anticuerpo completo (es decir, cadenas tanto pesada como ligera) se unen como un fragmento Fv de cadena sencilla y este polinucleótido se liga a un nucleótido que codifica para una proteína de la cubierta minoritaria de fago filamentoso. Cuando esta proteína de fusión se expresa en la superficie del fago, se identifica un polinucleótido que codifica para un anticuerpo específico mediante selección usando un antígeno inmovilizado.

Todavía en otro enfoque, se ensamblan fragmentos de anticuerpo como dos fragmentos Fab mediante fusión de una cadena a una proteína de fago y secreción de la otra al periplasma bacteriano [Hoogenboom *et al.*, Nucl Acids Res 19: 4133-4137 [1991]; Barbas *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA) 88: 7978-7982 (1991)].

La producción a gran escala de anticuerpos quiméricos, humanizados, injertados con CDR y completamente humanos o fragmentos de los mismos se produce normalmente mediante métodos recombinantes. Pueden introducirse molécula(s) de polinucleótido que codifica(n) para las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo o fragmentos del mismo en células huésped y expresarse usando materiales y procedimientos descritos en el presente documento. En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células huésped de mamífero, tales como células CHO. Se describen a continuación detalles de tal producción.

Parejas de fusión de agentes de unión específicos

En una realización adicional de la invención, los polipéptidos que comprenden los dominios variables de secuencias de aminoácidos de anticuerpos frente a Ang-2, tales como una región variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos tal como se describe en el presente documento o una región variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos tal como se describe en el presente documento, pueden fusionarse o bien en el extremo N-terminal o bien en el extremo C-terminal con uno o más dominios de una región Fc de IgG humana. Cuando se construye junto con una proteína terapéutica tal como el Fab de un anticuerpo específico de Ang-2, un dominio Fc puede proporcionar una vida media más larga o incorporar funciones tales como unión a receptor de Fc, unión a proteína A, fijación del complemento y quizás incluso transferencia placentaria. [Capon *et al.*, Nature, 337: 525-531 (1989)].

En un ejemplo, las regiones CH2, CH3 y bisagra del anticuerpo pueden fusionarse o bien en el extremo N-terminal o bien en el extremo C-terminal de los polipéptidos del agente de unión específico tales como un fragmento Fv o Fab anti-Ang-2 (obtenido, por ejemplo, de una biblioteca de presentación en fago) usando métodos conocidos por el experto en la técnica. La proteína de fusión resultante puede purificarse mediante el uso de una columna de afinidad de proteína A o proteína G. Se ha encontrado que los péptidos y proteínas fusionados a una región Fc presentan una vida media *in vivo* sustancialmente mayor que la equivalente sin fusionar. Además, una fusión con una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc que se produce de manera natural o puede alterarse para mejorar determinadas cualidades, tales como cualidades terapéuticas, tiempo de circulación, problemas de disminución de la agregación, etc. Otros ejemplos conocidos en la técnica incluyen aquellos en los que la región Fc, que puede ser humana o de otra especie, o puede ser sintética, se fusiona con el extremo N-terminal de CD30L para tratar la enfermedad de Hodgkin, linfoma anaplásico y leucemia de células T (patente estadounidense n.º 5.480.981), la región Fc se fusiona con el receptor de TNF para tratar el choque séptico [Fisher *et al.*, N Engl J Med, 334: 1697-1702 (1996)] y la región Fc se fusiona con el receptor Cd4 para tratar el SIDA [Capon *et al.*, Nature, 337: 525-31 (1989)].

Los anticuerpos catalíticos son otro tipo de molécula de fusión e incluyen anticuerpos en los que uno o más restos citotóxicos, o más generalmente uno o más restos biológicamente activos, se unen al agente de unión específico. Véase, por ejemplo [Rader *et al.*, Chem Eur J 12: 2091-2095 (2000)]. Los agentes citotóxicos de este tipo mejoran la citotoxicidad mediada por anticuerpos e incluyen restos tales como citocinas que estimulan directa o indirectamente la muerte celular, radioisótopos, fármacos quimioterápicos (incluyendo profármacos), toxinas bacterianas (por ejemplo exotoxina de *Pseudomonas*, toxina diftérica, etc.), toxinas vegetales (por ejemplo ricina, gelonina, etc.), conjugados químicos (por ejemplo, toxinas maitansinoides, caliqueamicina, etc.), radioconjugados, conjugados enzimáticos (conjugados de RNasa, terapia con enzima/profármaco dirigida por anticuerpo [ADEPT]) y similares. En un aspecto, el agente citotóxico puede "unirse" a un componente de un anticuerpo biespecífico o multiespecífico mediante la unión de este agente a uno de los sitios de reconocimiento de antígeno alternativos en el anticuerpo. Como alternativa, pueden expresarse citotoxinas proteicas como proteínas de fusión con el agente de unión específico tras el ligamiento de un polinucleótido que codifica para la toxina con un polinucleótido que codifica para el agente de unión. Todavía en otra alternativa, el agente de unión específico puede modificarse covalentemente para que incluya la citotoxina deseada.

Ejemplos de tales proteínas de fusión son polipéptidos inmunogénicos, proteínas con vida media circulantes largas, tales como regiones constantes de inmunoglobulina, proteínas marcadoras, proteínas o polipéptidos que facilitan la purificación del polipéptido de agente de unión específico deseado y secuencias de polipéptido que promueven la formación de proteínas multiméricas (tales como motivos de cremallera de leucina que son útiles en la formación/estabilidad de dímeros).

Este tipo de variante de inserción tiene generalmente toda o una parte sustancial de la molécula nativa, unida al

extremo N- o C-terminal, a toda o una parte de un segundo polipéptido. Por ejemplo, las proteínas de fusión emplean normalmente secuencias líder de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un huésped heterólogo. Otra proteína de fusión útil incluye la adición de un dominio inmunológicamente activo, tal como un epítipo de anticuerpo, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. La inclusión de un sitio de escisión en o cerca de la unión de fusión facilitará la eliminación del polipéptido extraño tras la purificación. Otras fusiones útiles incluyen la unión de dominios funcionales, tales como sitios activos de enzimas, dominios de glicosilación, señales de direccionamiento celular o regiones transmembrana.

Existen diversos sistemas de expresión de proteínas de fusión comercialmente disponibles que pueden usarse en la presente invención. Particularmente, los sistemas útiles incluyen pero no se limitan al sistema de glutatión-S-transferasa (GST) (Pharmacia), el sistema de proteína de unión a maltosa (NEB, Beverley, MA), el sistema FLAG (IBI, New Haven, CT) y el sistema 6xHis (Qiagen, Chatsworth, CA). Estos sistemas pueden producir polipéptidos recombinantes que llevan sólo un pequeño número de aminoácidos adicionales, que es improbable que afecten a la capacidad antigénica del polipéptido recombinante. Por ejemplo, tanto el sistema FLAG como el sistema 6xHis sólo añaden secuencias cortas, se sabe que ambos de los cuales son escasamente antigénicos y que no afectan adversamente al plegamiento del polipéptido para dar su conformación nativa. Otra fusión N-terminal que se contempla que es útil es la fusión de un dipéptido Met-Lys en la región N-terminal de la proteína o péptidos. Una fusión de este tipo puede producir aumentos beneficiosos en la expresión o actividad de la proteína.

Un constructo de fusión particularmente útil puede ser uno en el que un péptido de agente de unión específico se fusiona con un hapteno para potenciar la inmunogenicidad de un constructo de fusión de agente de unión específico que es útil, por ejemplo, en la producción de anticuerpos anti-idiotipo de la invención. Tales constructos de fusión que aumentan la inmunogenicidad los conocen bien los expertos en la técnica, por ejemplo, una fusión de agente de unión específico con un antígeno auxiliar tal como hsp70 o secuencias de péptido tales como de la cadena de la toxina diftérica o una citocina tal como IL-2 será útil para provocar una respuesta inmunitaria. En otras realizaciones, puede prepararse un constructo de fusión que potenciará el direccionamiento de composiciones del agente de unión a antígeno a un sitio o célula específicos.

También se contemplan otros constructos de fusión incluyendo polipéptidos heterólogos con propiedades deseadas, por ejemplo, una región constante de Ig para prolongar la semivida sérica o un anticuerpo o fragmento del mismo para direccionamiento. Otros sistemas de fusión producen híbridos de polipéptido en los que es deseable escindir la pareja de fusión del polipéptido deseado. En una realización, la pareja de fusión se une al polipéptido de agente de unión específico recombinante mediante una secuencia de péptido que contiene una secuencia de reconocimiento específica para una proteasa. Ejemplos de secuencias adecuadas son las reconocidas por la proteasa del virus del grabado del tabaco (Life Technologies, Gaithersburg, MD) o factor Xa (New England Biolabs, Beverley, MA).

La invención también proporciona polipéptidos de fusión que comprenden todo o parte de un dominio variable de un anticuerpo frente a Ang-2, tal como una región variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos tal como se describe en el presente documento o una región variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos tal como se describe en el presente documento en combinación con factor tisular truncado (tTF), un agente de direccionamiento vascular que consiste en una forma truncada de una proteína que induce coagulación humana que actúa como agente coagulante de vasos sanguíneos tumorales. La fusión de tTF con el anticuerpo anti-Ang-2 o fragmentos del mismo puede facilitar la administración de anti-Ang-2 a células diana.

Variantes de agentes de unión específicos

Las variantes de agentes de unión específicos de la presente invención incluyen variantes de inserción, deleción y/o sustitución. En un aspecto de la invención, se proporcionan variantes de inserción en las que uno o más residuos de aminoácido complementan una secuencia de aminoácidos de agente de unión específico. Las inserciones pueden ubicarse en cualquiera o ambos extremos terminales de la proteína, o pueden situarse dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácidos del agente de unión específico. Las variantes de inserción con residuos adicionales en cualquiera o ambos extremos terminales pueden incluir, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen etiquetas o marcadores de aminoácidos. Las variantes de inserción incluyen polipéptidos de agentes de unión específicos en los que se añaden uno o más residuos de aminoácido a una secuencia de aminoácidos del agente de unión específico o fragmento del mismo.

Los productos variantes de la invención también incluyen productos de agentes de unión específicos maduros. A tales productos de agentes de unión específicos se les ha eliminado las secuencias líder o señal, sin embargo, la proteína resultante tiene residuos amino terminales adicionales en comparación con el polipéptido de Ang-2 de tipo natural. Los residuos amino terminales adicionales pueden derivarse de otra proteína o pueden incluir uno o más residuos que no son identificables ya que se derivan de una proteína específica. Se contemplan productos de agentes de unión específicos con un residuo de metionina adicional en la posición 1 (Met¹-agente de unión específico), así como productos de agentes de unión específicos con residuos de metionina y lisina adicionales en las posiciones -2 y -1 (Met⁻²-Lys⁻¹-agente de unión específico). Variantes de agentes de unión específicos que tienen residuos de Met, Met-Lys, Lys adicionales (o uno o más residuos básicos en general) son particularmente útiles para la producción de proteína recombinante potenciada en células huésped bacterianas.

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

Las variantes de inserción también incluyen proteínas de fusión tal como se describió anteriormente, en las que los extremos amino y/o carboxilo terminal del polipéptido de agente de unión específico se fusionan con otro polipéptido, un fragmento del mismo o secuencias de aminoácidos que no se reconoce generalmente que son parte de cualquier secuencia de proteína específica.

En otro aspecto, la invención proporciona variantes de delección en las que se eliminan uno o más residuos de aminoácido en un polipéptido de agente de unión específico. Pueden efectuarse delecciones en uno o ambos extremos terminales del polipéptido de agente de unión específico o a partir de la eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos del agente de unión específico. Las variantes de delección incluyen necesariamente todos los fragmentos de un polipéptido de agente de unión específico.

Los fragmentos de anticuerpo incluyen las partes del anticuerpo que se unen a un epítipo en el polipéptido de antígeno. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen fragmentos Fab y F(ab')₂ generados, por ejemplo, mediante escisión enzimática o química de anticuerpos longitud completa. Otros fragmentos de unión incluyen los generados mediante técnicas de ADN recombinante, tales como la expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican para regiones variables de anticuerpo. La invención también abarca fragmentos de polipéptido de un agente de unión a Ang-2 en el que los fragmentos mantienen la capacidad para unirse específicamente a un polipéptido de Ang-2. Se comprenden en el presente documento fragmentos que comprenden al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 o más aminoácidos consecutivos de un péptido o polipéptido de la invención. Los fragmentos de polipéptido preferidos presentan propiedades inmunológicas únicas o específicas para el agente de unión a antígeno de la invención. Pueden prepararse fragmentos de la invención que tienen las propiedades inmunológicas deseadas mediante cualquiera de los métodos bien conocidos y puestos en práctica de manera rutinaria en la técnica.

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona variantes de sustitución de agentes de unión específicos de la invención. Se consideran generalmente que las variantes de sustitución son "similares" al polipéptido original o que tienen un determinado "porcentaje de identidad" con el polipéptido original, e incluyen los polipéptidos en los que se eliminan uno o más residuos de aminoácido de un polipéptido y se reemplazan por residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservativa, sin embargo, la invención abarca sustituciones que son también no conservativas.

La identidad y similitud de polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data*, parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991) y Carillo *et al.*, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988).

Se diseñan métodos preferidos para determinar la relación o porcentaje de identidad de dos polipéptidos para proporcionar el mayor apareamiento entre las secuencias sometidas a prueba. Se describen métodos para determinar la identidad en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 12: 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, citado anteriormente (1990)). También puede usarse el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

Determinados esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el apareamiento de sólo una región corta de las dos secuencias y esta región alineada pequeña puede tener una identidad de secuencia muy alta aún cuando no hay relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el método de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos el diez por ciento de la longitud completa del polipéptido diana que está comparándose, es decir, al menos 40 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de al menos 400 aminoácidos, 30 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de al menos 300 a aproximadamente 400 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de 200 a aproximadamente 300 aminoácidos y al menos 10 aminoácidos contiguos cuando están

comparándose secuencias de aproximadamente 100 a 200 aminoácidos.

5 Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), se alinean dos polipéptidos para los que va a determinarse el porcentaje de identidad de secuencia para apareamiento óptimo de sus aminoácidos respectivos (el "tramo apareado", tal como se determina mediante el algoritmo). En determinadas realizaciones, se usan una penalización por apertura de hueco (que se calcula normalmente como 3X la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que está usándose; la "diagonal" es la puntuación o número asignado para cada apareamiento de aminoácidos perfecto por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de hueco (que habitualmente es 1/10 veces la penalización por apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 conjuntamente con el algoritmo. En determinadas realizaciones, el algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véanse Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3) (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).

10 En determinadas realizaciones, los parámetros para una comparación de secuencias de polipéptido incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman *et al.*, J. Mol. Biol., 48: 443-453 (1970);

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, citado anteriormente (1992);

Penalización por hueco: 12

Penalización por longitud de hueco: 4

20 Umbral de similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En determinadas realizaciones, los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto con ninguna penalización para huecos de extremos) usando el algoritmo GAP.

25 En determinadas realizaciones, los parámetros para comparaciones de secuencias de moléculas de polinucleótido incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman *et al.*, citado anteriormente (1970);

Matriz de comparación: apareamientos = +10, apareamiento erróneo = 0

Penalización por hueco: 50

Penalización por longitud de hueco: 3

30 El programa GAP también puede ser útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de moléculas de polinucleótido.

35 Pueden usarse otros algoritmos, penalizaciones por apertura de hueco, penalizaciones por extensión de hueco, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc. a modo de ejemplo, incluyendo los descritos en el Program Manual, Wisconsin Package, versión 9, Setiembre, 1997. Las elecciones particulares que van a hacerse resultarán evidentes para los expertos en la técnica y dependerán de la comparación específica que va a hacerse, tal como ADN con ADN, proteína con proteína, proteína con ADN; y adicionalmente, si la comparación es entre pares de secuencias dadas (en cuyo caso se prefieren generalmente GAP o BestFit) o entre una secuencia y una base de datos de secuencias grande (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).

40 Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology--A Synthesis (2ª edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que se incorpora en el presente documento como referencia para cualquier fin.

45 Los aminoácidos pueden tener estereoquímica o bien L o bien D (excepto para Gly, que no es ni L ni D) y los polipéptidos y las composiciones de la presente invención pueden comprender una combinación de estereoquímicas. Sin embargo, se prefiere la estereoquímica L. La invención también proporciona moléculas inversas en las que se invierte la secuencia amino terminal a carboxilo terminal de los aminoácidos. Por ejemplo, la inversa de una molécula que tiene la secuencia normal $X_1-X_2-X_3$ sería $X_3-X_2-X_1$. La invención también proporciona moléculas retroinversas en las que, como anteriormente, se invierte la secuencia amino terminal a carboxilo terminal de aminoácidos y los residuos que normalmente son enantiómeros "L" se alteran a la forma de estereoisómero "D".

50 Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α -, α -disustituidos, N-alquil-aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los

ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen, sin limitación: ácido aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido aminobutírico, ácido piperidínico, ácido aminocaproico, ácido aminoheptanoico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilaspargina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, orbitina, 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos y aminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina).

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo a mano izquierda de secuencias de polinucleótido monocatenarias es el extremo 5'; la dirección a mano izquierda de secuencias de polinucleótido bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina la dirección de transcripción; regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 5'"; regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 3'".

Las sustituciones de aminoácido conservativas pueden abarcar residuos de aminoácido que no se producen de manera natural, que se incorporan normalmente mediante síntesis de péptidos química en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácido.

Los residuos que se producen de manera natural pueden dividirse en clases basándose en propiedades de cadenas laterales comunes:

1) hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) ácidos: Asp, Glu;

4) básicos: His, Lys, Arg;

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

6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al hacer tales cambios, según determinadas realizaciones, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de carga e hidrofobicidad. Son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se entiende en la técnica la importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a una proteína. Kyte *et al.*, J. Mol. Biol., 157: 105-131 (1982). Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y conservan todavía una actividad biológica similar. Al hacer cambios basándose en el índice hidropático, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 . En determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro de ± 1 , y en determinadas realizaciones, se incluyen aquellos dentro de $\pm 0,5$.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente basándose en la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína o el péptido biológicamente funcional creado de ese modo está destinado para su uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. En determinadas realizaciones, la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, determinada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a estos residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al hacer cambios basándose en valores de hidrofiliidad similares, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de

hidrofilicidad están dentro de ± 2 , en determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro de ± 1 , y en determinadas realizaciones, se incluyen aquellos dentro de $\pm 0,5$. También pueden identificarse epítomos a partir de secuencias de aminoácidos primarias basándose en la hidrofilicidad. Estas regiones también se denominan "regiones de núcleo epitópico".

5 Se exponen sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo en la tabla 1.

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, Glu, Asp	Gln
Asp	Glu, Gln, Asn	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn, Glu, Asp	Asn
Glu	Asp, Asn, Gln	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

10 Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido tal como se expone en el presente documento usando técnicas bien conocidas. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad por regiones de direccionamiento que no se cree que sean importantes para la actividad. En determinadas realizaciones, pueden identificarse residuos y partes de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En determinadas realizaciones, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar de manera adversa a la estructura del polipéptido.

15 Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de una comparación de este tipo, puede predecirse la importancia de residuos de aminoácido en una proteína que corresponden a residuos de aminoácido que son importantes para la actividad o estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales residuos de aminoácido importantes pronosticados.

Un experto en la técnica puede analizar también la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con la estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, un experto en la técnica puede pronosticar la alineación de residuos de aminoácido de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede elegir no hacer cambios radicales en residuos de aminoácido que se pronostica que están en la superficie de la proteína, dado que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una sustitución de un único aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Entonces, las variantes pueden seleccionarse usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes podrían usarse para reunir información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio a un residuo de aminoácido particular daba como resultado una actividad destruida, reducida de manera no deseada o inadecuada, pueden evitarse variantes con un cambio de este tipo. En otras palabras, basándose en la información reunida a partir de tales experimentos de rutina, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse sustituciones adicionales o bien solas o bien en combinación con otras mutaciones.

Se han dedicado varias publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véanse Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7 (4): 422-427 (1996), Chou *et al.*, *Biochemistry*, 13 (2): 222-245 (1974); Chou *et al.*, *Biochemistry*, 113 (2): 211-222 (1974); Chou *et al.*, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978); Chou *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276 y Chou *et al.*, *Biophys. J.*, 26: 367-384 (1979). Además, están disponibles actualmente programas informáticos para ayudar a la predicción de la estructura secundaria. Un método de predicción de la estructura secundaria se basa en modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia mayor del 30% o una similitud mayor del 40% tienen a menudo topologías estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructurales de proteínas (PDB) ha proporcionado un aumento de la capacidad de predicción de la estructura secundaria, incluyendo el posible número de pliegues dentro de la estructura de un polipéptido o una proteína. Véase Holm *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 27 (1): 244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner *et al.*, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7 (3): 369-376 (1997)) que existe un número limitado de pliegues en un polipéptido o una proteína dada y que una vez que se hayan resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se hará drásticamente más precisa.

Los métodos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen "reconocimiento de plegamiento" ("threading") (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3): 377-87 (1997); Sippl *et al.*, *Structure*, 4 (1): 15-19 (1996)), "análisis del perfil" (Bowie *et al.*, *Science*, 253: 164-170 (1991); Gribskov *et al.*, *Meth. Enzym.*, 183: 146-159 (1990); Gribskov *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13): 4355-4358 (1987)) y "enlace evolutivo" (Véase Holm, citado anteriormente (1999) y Brenner, citado anteriormente (1997)).

En determinadas realizaciones, las variantes de anticuerpos incluyen variantes de glicosilación en las que el número y/o tipo de sitio de glicosilación se ha alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido original. En determinadas realizaciones, las variantes de proteínas comprenden un mayor o menor número de sitios de glicosilación N-unidos que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación N-unido se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácido para crear esta secuencia proporciona un nuevo sitio posible para la adición de una cadena de hidrato de carbono N-unida. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de hidrato de carbono N-unida existente. Se proporciona también una redistribución de cadenas de hidratos de carbono N-unidas en la que se eliminan uno o más sitios de glicosilación N-unidos (normalmente los que se producen de manera natural) y se crean uno o más sitios N-unidos nuevos. Las variantes de anticuerpos preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que uno o más residuos de cisteína se delecionan de o se sustituyen por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos parental. Variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos deben replegarse para dar una conformación biológicamente activa tal como tras el aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen generalmente menos residuos de cisteína que la proteína nativa y tienen normalmente un número par para minimizar interacciones que resultan de cisteínas no apareadas.

Según determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos 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 proteicos, (4) alteran las afinidades de unión y/o (5) confieren o modifican otras propiedades funcionales en tales polipéptidos. Según determinadas realizaciones, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (en determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (en determinadas realizaciones, en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares). En determinadas realizaciones, normalmente una sustitución de aminoácidos conservativa no puede cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica 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 *et al.* *Nature* 354: 105 (1991).

Para variantes de anticuerpo, la cadena pesada puede tener 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácido reemplazado, mientras que la cadena ligera puede tener 2 ó 1 aminoácido(s) reemplazado(s).

Derivados de agentes de unión específicos

5 La invención también proporciona derivados de polipéptidos de agentes de unión específicos. Los derivados incluyen polipéptidos de agentes de unión específicos que llevan modificaciones distintas de inserción, delección o sustitución de residuos de aminoácido. Preferiblemente, las modificaciones son de naturaleza covalente e incluyen por ejemplo, enlace químico con polímeros, lípidos, otros restos orgánicos e inorgánicos. Los derivados de la invención pueden prepararse para aumentar la vida media circulante de un polipéptido de agente de unión específico o pueden diseñarse para mejorar la capacidad de direccionamiento del polipéptido a células, tejidos u
10 órganos deseados.

La invención también abarca agentes de unión derivados modificados covalentemente para incluir una o más uniones de polímero soluble en agua tal como polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol tal como se describe en las patentes estadounidenses n.^{os}: 4.640.835, 4.496,689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179. 337. Todavía otros polímeros útiles conocidos en la técnica incluyen monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa u
15 otros polímeros a base de hidratos de carbono, poli-(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y poli(alcohol vinílico), así como mezclas de estos polímeros. Se prefieren particularmente productos de agentes de unión específicos modificados covalentemente con subunidades de polietilenglicol (PEG). Los polímeros solubles en agua pueden unirse en posiciones específicas, por ejemplo en el extremo amino terminal de los productos de
20 agentes de unión específicos, o pueden unirse aleatoriamente a una o más cadenas laterales del polipéptido. El uso de PEG para mejorar la capacidad terapéutica del agente de unión específico, y de anticuerpos humanizados en particular, se describe en la patente estadounidense n.^o 6.133.426 concedida a Gonzales *et al.*, expedida el 17 de octubre de 2000.

Sitios diana para mutagénesis de anticuerpos

25 Pueden emplearse determinadas estrategias para manipular propiedades inherentes de un anticuerpo específico de Ang-2, tal como la afinidad del anticuerpo por su diana. Estas estrategias incluyen el uso de mutagénesis específica al sitio o al azar de la molécula de polinucleótido que codifica para el anticuerpo para generar variantes del anticuerpo, seguido por una etapa de selección diseñada para recuperar variantes del anticuerpo que presentan el cambio deseado, por ejemplo aumento o disminución de la afinidad.

30 Los residuos de aminoácido más comúnmente seleccionados como diana en estrategias mutagénicas son los de las CDR. Tal como se describió anteriormente, estas regiones contienen los residuos que interactúan realmente con Ang-2 y otros aminoácidos que afectan a la disposición espacial de estos residuos. Sin embargo, se ha mostrado que los aminoácidos en las regiones de entramado de los dominios variables fuera de las regiones CDR hacen contribuciones sustanciales a las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo, y pueden seleccionarse como
35 diana para manipular tales propiedades. Véase Hudson, *Curr Opin Biotech*, 9: 395-402 (1999) y referencias en el mismo.

Pueden producirse bibliotecas más pequeñas y más eficazmente examinadas de variantes de anticuerpo restringiendo la mutagénesis al azar o dirigida al sitio a sitios en las CDR que corresponden a zonas propensas a "hipermutación" durante el proceso de maduración de la afinidad somática. Véase Chowdhury y Pastan, *Nature Biotech*, 17: 568-572 [1999] y referencias en el mismo. Los tipos de elementos de ADN que se sabe que definen
40 sitios de hipermutación de esta manera incluyen repeticiones directas e invertidas, determinadas secuencias consenso, estructuras secundarias y palíndromos. Las secuencias de ADN consenso incluyen la secuencia de tetrabase Purina-G-Pirimidina-A/T (es decir, A o G - G - C o T - A o T) y el codón de serina AGY (en el que Y puede ser una C o una T).

45 Por tanto, una realización de la presente descripción incluye estrategias mutagénicas con el objetivo de aumentar la afinidad de un anticuerpo por su diana. Estas estrategias incluyen mutagénesis de la cadena pesada y ligera variable completa, mutagénesis sólo de las regiones CDR, mutagénesis de los sitios de hipermutación consenso dentro de las CDR, mutagénesis de regiones de entramado o cualquier combinación de estos enfoques ("mutagénesis" en este contexto podría ser al azar o dirigida al sitio). Puede lograrse una delineación definitiva de las
50 regiones CDR y la identificación de residuos que comprenden el sitio de unión de un anticuerpo resolviendo la estructura del anticuerpo en cuestión, y el complejo anticuerpo-ligando, a través de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como cristalografía de rayos X. Los expertos en la técnica conocen diversos métodos basados en análisis y caracterización de tales estructuras cristalinas de anticuerpos y pueden emplearse, aunque no de manera definitiva, para aproximar las regiones CDR. Los ejemplos de tales métodos comúnmente usados
55 incluyen las definiciones de Kabat, Chothia, AbM y de contacto.

La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia y es la definición más comúnmente usada para predecir regiones CDR. [Johnson y Wu, *Nucleic Acids Res*, 28: 214-8 (2000)]. La definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucles estructurales. [Chothia *et al.*, *J Mol Biol*, 196: 901-17 (1986); Chothia *et al.*,

Nature, 342: 877-83 (1989)]. La definición de AbM es un compromiso entre la definición de Kabat y la de Chothia. AbM es una serie integral de programas para modelado de la estructura de anticuerpos producidos por Oxford Molecular Group [Martin *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA) 86: 9268-9272 (1989); Rees, *et al.*, ABM™, a computer program for modeling variable regions of antibodies, Oxford, R.U.; Oxford Molecular, Ltd.]. La serie AbM modela la estructura terciaria de un anticuerpo a partir de la secuencia primaria usando una combinación de bases de datos de conocimiento y métodos desde el principio. Se ha introducido recientemente una definición adicional, conocida como la definición de contacto. [MacCallum *et al.*, J Mol Biol, 5: 732-45 (1996)]. Esta definición se basa en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles.

Por convención, las regiones CDR en la cadena pesada se denominan normalmente H1, H2 y H3 y se numeran secuencialmente en orden contando desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal. Las regiones CDR en la cadena ligera se denominan normalmente L1, L2 y L3 y se numeran secuencialmente en orden contando desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal.

La CDR-H1 es de aproximadamente 10 a 12 residuos de longitud y comienza normalmente 4 residuos tras una Cys según las definiciones de Chothia y AbM o normalmente 5 residuos después según la definición de Kabat. A la H1 normalmente le sigue un Trp, normalmente Trp-Val, pero también Trp-Ile o Trp-Ala. La longitud de H1 es de aproximadamente 10 a 12 residuos según la definición de AbM mientras que la definición de Chothia excluye los últimos 4 residuos.

La CDR-H2 comienza normalmente 15 residuos después del extremo de H1 según la definición de Kabat y AbM. Los residuos que preceden a H2 normalmente son Leu-Glu-Trp-Ile-Gly pero existen varias variaciones. A H2 normalmente le sigue la secuencia de aminoácidos Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala. Según la definición de Kabat, la longitud de la H2 es de aproximadamente 16 a 19 residuos, pronosticando la definición de AbM que la longitud es normalmente de 9 a 12 residuos.

La CDR-H3 comienza normalmente 33 residuos tras el extremo de H2 y va precedida normalmente por la secuencia de aminoácidos (normalmente Cys-Ala-Arg). A la H3 normalmente le sigue la secuencia de aminoácidos Gly. La longitud de H3 puede estar en cualquier lugar entre 3 y 25 residuos.

La CDR-L1 comienza normalmente en aproximadamente el residuo 24 y le seguirá normalmente una Cys. El residuo tras la CDR-L1 es siempre un Trp e iniciará normalmente la secuencia Trp-Tyr-Gln, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln o Trp-Tyr-Leu. La longitud de CDR-L1 es de aproximadamente 10 a 17 residuos. La CDR-L1 punitiva para los anticuerpos de la invención sigue este patrón exactamente con un residuo de Cys seguido por 15 aminoácidos, luego Trp-Tyr-Gln.

La CDR-L2 comienza aproximadamente 16 residuos tras el extremo de L1. Le seguirán generalmente los residuos Ile-Tyr, Val-Tyr, Ile-Lys o Ile-Phe. La longitud de CDR-L2 es de aproximadamente 7 residuos.

La CDR-L3 comienza normalmente 33 residuos tras el extremo de L2 y le sigue normalmente una Cys. A L3 le sigue normalmente la secuencia de aminoácidos Phe-Gly-XXX-Gly. La longitud de L3 es de aproximadamente 7 a 11 residuos.

Se han descrito en la técnica diversos métodos para modificar anticuerpos. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.530.101 (concedida a Queen *et al.*, 25 de junio de 1996) describe métodos para producir anticuerpos humanizados en los que el entramado de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina humanizada es del 65% al 95% idéntica a la secuencia del entramado de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina donadora. Cada cadena de inmunoglobulina humanizada comprenderá habitualmente, además de las CDR, aminoácidos del entramado de la inmunoglobulina donadora que pueden, por ejemplo, interactuar con las CDR para afectar a la afinidad de unión, tales como uno o más aminoácidos que son inmediatamente adyacentes a una CDR en la inmunoglobulina donadora o aquellos dentro de aproximadamente 3 angstroms tal como se pronostica mediante modelado molecular. Cada una de las cadenas pesada y ligera puede diseñarse usando uno cualquiera o todos los diversos criterios de posición. Cuando se combinan para dar un anticuerpo intacto, las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención serán sustancialmente no inmunogénicas en seres humanos y conservarán sustancialmente la misma afinidad que la inmunoglobulina donadora frente al antígeno, tal como una proteína u otro compuesto que contiene un epítipo. Véase también métodos relacionados en la patente estadounidense n.º 5.693.761 concedida a Queen, *et al.*, expedida el 2 de diciembre de 1997 ("Polinucleótidos que codifican para inmunoglobulinas humanizadas mejoradas"); la patente estadounidense n.º 5.693.762 concedida a Queen, *et al.*, expedida el 2 de diciembre de 1997 ("Inmunoglobulinas humanizadas"); la patente estadounidense n.º 5.585.089 concedida a Queen, *et al.* expedida el 17 de diciembre de 1996 ("Inmunoglobulinas humanizadas").

En un ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.565.332 concedida a Hoogenboom *et al.* expedida el 15 de octubre de 1996 ("Producción de anticuerpos quiméricos – un enfoque combinatorio") describe métodos para la producción de anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos que tienen especificidad de unión similar que un anticuerpo original pero que tienen características humanas aumentadas. Los anticuerpos humanizados se obtienen mediante intercambio de cadenas, usando, por ejemplo, tecnología de presentación en fago, y un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera o pesada de un anticuerpo no humano específico para un antígeno de interés

se combina con un repertorio de dominios variables de cadenas complementarios (pesados o ligeros) humanos. Se identifican apareamientos híbridos que son específicos para el antígeno de interés y las cadenas humanas de los apareamientos seleccionados se combinan con un repertorio de dominios variables complementarios humanos (pesados o ligeros). En otra realización, un componente de una CDR de un anticuerpo no humano se combina con un repertorio de partes de componentes de CDR de anticuerpos humanos. A partir de la biblioteca resultante de dímeros de polipéptido de anticuerpos, se seleccionan híbridos y se usan en una segunda etapa de intercambio humanizante. Alternativamente, esta segunda etapa se elimina si el híbrido ya es de carácter humano suficiente como para ser de valor terapéutico. También se describen métodos de modificación para aumentar el carácter humano. Véase también Winter, FEBS Letts 430: 92-92 (1998).

10 Como otro ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.054.297 concedida a Carter *et al.*, expedida el 25 de abril de 2000 describe un método para preparar anticuerpos humanizados sustituyendo una secuencia de aminoácidos de CDR por la secuencia de aminoácidos de CDR humana correspondiente y/o sustituyendo una secuencia de aminoácidos FR por las secuencias de aminoácidos FR humanas correspondientes.

15 Como otro ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.766.886 concedida a Studnicka *et al.*, expedida el 16 de junio de 1998 ("Dominios variables de anticuerpos modificados") describe métodos para identificar los residuos de aminoácido de un dominio variable de anticuerpo que puede modificarse sin disminuir la afinidad nativa del dominio de unión a antígeno mientras que se reduce su inmunogenicidad con respecto a una especie heteróloga y métodos para preparar estos dominios variables de anticuerpos modificados que son útiles para la administración a especies heterólogas. Véase también la patente estadounidense n.º 5.869.619 concedida a Studnicka expedida el 9 de febrero de 1999.

20 Tal como se discute, la modificación de un anticuerpo por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica se diseña normalmente para lograr una afinidad de unión aumentada por antígeno y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo en el receptor. En un enfoque, pueden modificarse anticuerpos humanizados para eliminar sitios de glicosilación con el fin de aumentar la afinidad del anticuerpo por su antígeno relacionado [Co *et al.*, Mol Immunol 30: 1361-1367 (1993)]. Técnicas tales como "reconformación", "hiperquimerización" y "restauración/revestimiento" han producido anticuerpos humanizados con mayor potencial terapéutico. [Vaswami *et al.*, Annals of Allergy, Asthma & Immunol 81:105 (1998); Roguska *et al.*, Prot Engineer 9: 895-904 (1996)]. Véase también la patente estadounidense n.º 6.072.035 concedida a Hardman *et al.*, expedida el 6 de junio de 2000, que describe métodos para reconformar anticuerpos. Aunque estas técnicas disminuyen la inmunogenicidad del anticuerpo reduciendo el número de residuos foráneos, no impiden respuestas anti-idiotípicas y anti-alotípicas tras la administración repetida de los anticuerpos. Se describen alternativas a estos métodos para reducir la inmunogenicidad en Gilliland *et al.*, J Immunol 62 (6): 3663-71 (1999).

25 En muchos casos, la humanización de anticuerpos da como resultado una pérdida de capacidad de unión a antígeno. Por tanto, es preferible "retromutar" el anticuerpo humanizado para incluir uno o más de los residuos de aminoácido encontrados en el anticuerpo original (lo más a menudo un roedor) en un intento por restablecer la afinidad de unión del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Saldanha *et al.*, Mol Immunol 36: 709-19 (1999).

Agentes de unión específicos no peptídicos análogos/miméticos a proteína

30 Además, también se contemplan análogos de agentes de unión específicos no peptídicos de péptidos que proporcionan una estructura estabilizada o biodegradación reducida. Pueden prepararse análogos miméticos a péptidos de agentes de unión específicos basándose en un péptido inhibidor seleccionado mediante el reemplazo de uno o más residuos por restos no peptídicos. Preferiblemente, los restos no peptídicos permiten al péptido conservar su conformación natural o estabilizar una conformación preferida, por ejemplo, bioactiva, que conserva la capacidad para reconocer y unirse a Ang-2. En un aspecto, el análogo/mimético resultante presenta afinidad de unión aumentada por Ang-2. Se describe un ejemplo de métodos para la preparación de análogos miméticos no peptídicos a partir de péptidos de agentes de unión específicos en Nachman *et al.*, Regul Pept 57: 359-370 (1995). Si se desea, los péptidos de agentes de unión específicos pueden modificarse, por ejemplo, mediante glicosilación, amidación, carboxilación o fosforilación o mediante la creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres, en particular ésteres C-terminales y derivados de N-acilo de los péptidos de la invención. Los péptidos de agentes de unión específicos también pueden modificarse para crear derivados peptídicos formando complejos covalentes o no covalentes con otros restos. Pueden prepararse complejos unidos covalentemente uniendo los restos químicos a grupos funcionales en las cadenas laterales de aminoácidos que comprenden los péptidos de agentes de unión específico o al extremo N o C terminal.

35 En particular, se anticipa que los péptidos de agentes de unión específicos pueden conjugarse con un grupo indicador, incluyendo, pero sin limitarse a un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima (por ejemplo, que cataliza una reacción colorimétrica o fluorométrica), un sustrato, una matriz sólida o un portador (por ejemplo, biotina o avidina). La invención proporciona por consiguiente una molécula que comprende una molécula de anticuerpo, en la que la molécula comprende además preferiblemente un grupo indicador seleccionado del grupo que consiste en un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima, un sustrato, una matriz sólida y un portador. Tales marcadores los conocen bien los expertos en la técnica, por ejemplo, se contemplan particularmente marcadores de biotina. El uso de tales marcadores lo conocen bien los expertos en la técnica y se describe en, por

ejemplo, la patente estadounidense n.º 3.817.837; la patente estadounidense n.º 3.850.752; la patente estadounidense n.º 3.996.345 y la patente estadounidense n.º 4.277.437. Otros marcadores que serán útiles incluyen pero no se limitan a marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes y marcadores quimioluminiscentes. Las patentes estadounidenses referentes al uso de tales marcadores incluyen por ejemplo la patente estadounidense n.º 3.817.837; la patente estadounidense n.º 3.850.752; la patente estadounidense n.º 3.939.350 y la patente estadounidense n.º 3.996.345. Cualquiera de los péptidos de la presente descripción puede comprender uno, dos o más de cualquiera de estos marcadores.

Métodos para preparar agentes de unión específicos

Pueden prepararse agentes de unión específicos de la presente invención que son proteínas mediante síntesis química en disolución o sobre un soporte sólido según técnicas convencionales. El límite actual para la síntesis en fase sólida es de aproximadamente 85-100 aminoácidos de longitud. Sin embargo, pueden usarse a menudo técnicas de síntesis química para ligar químicamente una serie de péptidos más pequeños para generar polipéptidos de longitud completa. Diversos sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y pueden usarse según protocolos conocidos. Véanse, por ejemplo, Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª. ed., Pierce Chemical Co., (1984); Tam *et al.*, *J Am Chem Soc*, 105: 6442, (1983); Merrifield, *Science*, 232: 341-347, (1986); y Barany y Merrifield, *The peptides*, Gross y Meienhofer, eds, Academic Press, Nueva York, 1-284; Barany *et al.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 30, 705-739 (1987); y la patente estadounidense n.º 5.424.398, cada uno incorporado en el presente documento como referencia.

Los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida usan un copoli(estireno-divinilbenceno) que contiene aminas 0,1-1,0 mM/g de polímero. Estos métodos para síntesis de péptidos usan protección con butiloxicarbonilo (t-BOC) o 9-fluorenilmetiloxi-carbonilo (FMOC) de grupos alfa-amino. Ambos métodos implican síntesis por etapas mediante lo cual se añade un único aminoácido en cada etapa comenzando desde el extremo C-terminal del péptido (Véase, Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991, unidad 9). Tras completar la síntesis química, el péptido sintético puede desprotegerse para eliminar los grupos bloqueantes de aminoácidos t-BOC o FMOC y escindirse del polímero mediante tratamiento con ácido a temperatura reducida (por ejemplo, HF líquido-anisól al 10% durante de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 hora a 0°C). Tras la evaporación de los reactivos, los péptidos de agentes de unión específicos se extraen del polímero con disolución de ácido acético al 1% que luego se liofiliza para producir el material bruto. Esto puede purificarse normalmente mediante técnicas tales como filtración en gel sobre Sephadex G-15 usando ácido acético al 5% como disolvente. La liofilización de fracciones apropiadas de la columna producirá el péptido de agente de unión específico homogéneo o derivados de péptidos, que entonces pueden caracterizarse mediante técnicas convencionales tales como análisis de aminoácidos, cromatografía en capa fina, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectroscopía de absorción ultravioleta, rotación molar, solubilidad y cuantificarse mediante degradación de Edman en fase sólida.

La síntesis química de anticuerpos anti-Ang-2, derivados, variantes y fragmentos de los mismos, así como otros agentes de unión a Ang-2 a base de proteína permite la incorporación de aminoácidos que no se producen de manera natural en el agente.

Las técnicas de ADN recombinante son un método conveniente para preparar anticuerpos de longitud completa y otros agentes de unión específicos proteínicos grandes de la presente invención, o fragmentos de los mismos. Una molécula de ADNc que codifica para el anticuerpo o fragmento puede insertarse en un vector de expresión, que a su vez puede insertarse en una célula huésped para la producción del anticuerpo o fragmento. Se entiende que los ADNc que codifican para tales anticuerpos pueden modificarse para variar a partir del ADNc "original" (traducido a partir del ARNm) para proporcionar degeneración de codones o para permitir el uso preferencial de codones en diversas células huésped.

Generalmente, una molécula de ADN que codifica para un anticuerpo puede obtenerse usando procedimientos descritos en el presente documento en los ejemplos. Cuando es deseable obtener moléculas Fab o CDR que están relacionados con la molécula de anticuerpo original, puede examinarse una biblioteca adecuada (biblioteca de presentación en fago; biblioteca de linfocitos, etc.) usando técnicas convencionales para identificar y clonar Fab/CDR relacionados. Las sondas usadas para tal examen pueden ser sondas Fab de longitud completa o truncadas que codifican para la parte Fab del anticuerpo original, sondas contra una o más CDR de la parte Fab del anticuerpo original u otras sondas adecuadas. Cuando se usan como sondas fragmentos de ADN, las condiciones de hibridación típicas son las expuestas en Ausubel *et al.* (*Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols Press [1994]). Tras la hibridación, la sonda transferida puede lavarse a una astringencia adecuada, dependiendo de factores tales como tamaño de sonda, homología esperada de la sonda con el clon, el tipo de biblioteca que se está seleccionando y el número de clones que están seleccionando. Los ejemplos de selección de alta astringencia son 0,1 X SSC y SDS al 0,1 por ciento a una temperatura de entre 50-65°C.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de huésped/vector de expresión para contener y expresar las moléculas de polinucleótido que codifican para los anticuerpos de la invención. Estos sistemas incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN de plásmido o cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales

transfectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmido pBR322 o Ti); o sistemas de células animales.

5 Las células de mamífero que son útiles en producciones de proteínas de agentes de unión específicos recombinantes incluyen pero no se limitan a células VERO, células HeLa, líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), células COS (tal como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293, así como líneas celulares de hibridoma tal como se describe en el presente documento. Se prefieren células de mamífero para la preparación de los agentes de unión específicos tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que normalmente están glicosilados y requieren repliegamiento apropiado para su actividad. Las células de mamífero preferidas incluyen células CHO, células de hibridoma y células mieloides.

Algunos protocolos a modo de ejemplo para la expresión recombinante de las proteínas de agentes de unión específicos se describen en el presente documento a continuación.

15 El término "vector de expresión" se refiere a un plásmido, fago, virus o vector, para expresar un polipéptido a partir de una secuencia de ADN (ARN). Un vector de expresión puede comprender una unidad transcripcional que comprende un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tiene(n) un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una secuencia estructural o secuencia que codifica para el agente de unión que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción apropiadas. Las unidades estructurales destinadas para su uso en sistemas de expresión eucariotas o de levadura incluyen preferiblemente una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, cuando se expresa proteína de agente de unión específico recombinante sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina amino terminal. Este residuo puede escindirse o no posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto de agente de unión específico final.

25 Por ejemplo, los agentes de unión específicos pueden expresarse de manera recombinante en levadura usando un sistema de expresión disponible comercialmente, por ejemplo, el Pichia Expression System (Invitrogen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema también se basa en la secuencia pre-pro-alfa para dirigir la secreción, pero la transcripción del inserto se dirige mediante el promotor de alcohol oxidasa (AOX1) tras la inducción por metanol.

30 El péptido de agente de unión específico secretado se purifica del medio de crecimiento de la levadura mediante, por ejemplo, los métodos usados para purificar el péptido de sobrenadantes de células de mamífero y bacterianas.

35 Alternativamente, el ADNc que codifica para el péptido de agente de unión específico puede clonarse en el vector de expresión de baculovirus pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Este vector puede usarse según las instrucciones del fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en medios libres de proteína sf9 y para producir proteína recombinante. La proteína de agente de unión específico puede purificarse y concentrarse de los medios usando una columna de heparina-Sepharose (Farmacia).

40 Alternativamente, el péptido puede expresarse en un sistema de insecto. Los sistemas de insecto para la expresión de proteína los conocen bien los expertos en la técnica. En un sistema de este tipo, puede usarse el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos en células de *Spodoptera frugiperda* o en *Trichoplusia larvae*. La secuencia que codifica para el péptido de agente de unión específico puede clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y colocarse bajo control del promotor de polihedrina. La inserción exitosa del péptido de agente de unión específico inactivará el gen de polihedrina y producirá virus recombinante que carece de cubierta protéica. Los virus recombinantes pueden usarse para infectar células de *S. frugiperda* o *Trichoplusia larvae* en las que el péptido se expresa [Smith *et al.*, J Virol 46: 584 (1983); Engelhard *et al.*, Proc Nat Acad Sci (USA) 91: 3224-7 (1994)].

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

La expresión de polinucleótidos que codifican para anticuerpos anti-Ang-2 y fragmentos de los mismos usando los sistemas recombinantes descritos anteriormente puede dar como resultado la producción de anticuerpos o

fragmentos de los mismos que deben “replegarse” (para crear apropiadamente diversos puentes disulfuro) con el fin de que sean biológicamente activos. Se exponen procedimientos de replegamiento típicos para tales anticuerpos en los ejemplos en el presente documento y en la siguiente sección.

5 Pueden producirse agentes de unión específicos preparados en células bacterianas como cuerpo de inclusión insoluble en las bacterias, pueden purificarse tal como sigue. Las células huésped pueden sacrificarse mediante centrifugación; lavarse en NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; y tratarse con lisozima 0,1 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El lisado puede aclararse mediante sonicación y los residuos celulares pueden sedimentarse mediante centrifugación durante 10 minutos a 12.000 X g. El sedimento que contiene agente de unión específico puede resuspenderse en Tris 50 mM, pH 8 y EDTA 10 mM, depositarse sobre glicerol al 50% y centrifugarse durante 30 min. a 6000 X g. El sedimento puede resuspenderse en solución salina tamponada con fosfato convencional (PBS) libre de Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺. El agente de unión específico puede purificarse además fraccionando el sedimento resuspendido en un gel de SDS poliacrilamida desnaturalizante (Sambrook *et al.*, citado anteriormente). El gel puede empaparse en KCl 0,4 M para visualizar la proteína, que puede cortarse y someterse a electroelución en tampón de corrida de geles que carece de SDS. Si la proteína de fusión GST se produce en bacterias, como una proteína soluble, puede purificarse usando el módulo de purificación GST (Farmacia).

Los expertos en la técnica conocen bien sistemas huésped de mamífero para la expresión de la proteína recombinante. Pueden elegirse cepas de células huésped para una capacidad particular para procesar la proteína expresada o producir determinadas modificaciones postraduccionales que serán útiles para proporcionar la actividad de la proteína. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Diferentes células huésped tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, así como líneas celulares de hibridoma y similares tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y pueden elegirse para garantizar la modificación correcta y el procesamiento de la proteína foránea introducida.

25 Pueden usarse varios sistemas de selección para recuperar las células que se han transformado para la producción de proteínas recombinantes. Tales sistemas de selección incluyen, pero no se limitan a, genes de timidina cinasa de VHS, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa, en células tk-, hprt- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia anti-metabolitos como base de selección para DHFR que confiere resistencia a metotrexato; gpt que confiere resistencia a ácido micofenólico; neo que confiere resistencia al aminoglicósido G418 y confiere resistencia a clorsulfurón; e hygro que confiere resistencia a higromicina. Los genes seleccionables adicionales que pueden ser útiles incluyen trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina. Los marcadores que proporcionan una indicación visual para la identificación de transformantes incluyen antocianinas, β-glucuronidasa y su sustrato, GUS, y luciferasa y su sustrato, luciferina.

35 Purificación y replegamiento de agentes de unión específicos

En algunos casos, los agentes de unión específicos producidos usando procedimientos descritos anteriormente pueden necesitar “replegarse” y oxidarse para dar una estructura terciaria apropiada y generar enlaces disulfuro con el fin de ser biológicamente activos. El replegamiento puede lograrse usando varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, exponer el agente de polipéptido solubilizado a un pH habitualmente por encima de 7 en presencia de un agente caotrópico. La selección de caótropo es similar a las elecciones usadas para la solubilización de cuerpos de inclusión, sin embargo un caótropo se usa normalmente a una concentración inferior. Un agente caotrópico a modo de ejemplo es guanidina. En la mayoría de los casos, la disolución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor más su forma oxidada en una razón específica para generar un potencial redox particular que permite que se produzca el intercambio de disulfuros para la formación de puentes de cisteína. Algunas parejas redox comúnmente usadas incluyen cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditiotreitól DTT/ditiano DTT y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. En muchos casos, puede usarse un co-disolvente para aumentar la eficacia del replegamiento. Los codisolventes comúnmente usados incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y arginina.

50 Será deseable purificar proteínas de agentes de unión específicos o variantes de las mismas de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas de purificación de proteínas. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento bruto de las fracciones polipeptídicas y no polipeptídicas. Habiendo separado el polipéptido de agente de unión específico de otras proteínas, el polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o purificación hasta la homogeneidad). Métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido de agente de unión específico puro son cromatografía por intercambio de iones, cromatografía de exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida; isoelectroenfoque. Un método particularmente eficaz de purificación de péptidos es la cromatografía líquida rápida de proteínas o incluso HPLC.

60 Determinados aspectos de la presente descripción se refieren a la purificación, y en realizaciones particulares, a la purificación sustancial, de una proteína o péptido de agente de unión específico codificados. El término “proteína o péptido de agente de unión específico purificado” tal como se usa en el presente documento pretende referirse a una

composición, aislable de otros componentes, en la que la proteína o péptido de agente de unión específico se purifica hasta cualquier grado en relación con su estado obtenible de manera natural. Por tanto, una proteína o péptido de agente de unión específico purificado se refiere también a una proteína o péptido de agente de unión específico, libre del entorno en el que puede producirse de manera natural.

- 5 Generalmente, “purificado” se referirá a una composición de agente de unión específico que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros componentes diversos, y composición que conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa el término “sustancialmente purificado”, la designación se referirá a una composición de agente de unión específico en la que la proteína o péptido de agente de unión específico forma el componente principal de la composición, tal como que constituye aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o más de las proteínas en la composición.

15 Los expertos en la técnica conocerán diversos métodos para cuantificar el grado de purificación del agente de unión específico en vista de la presente descripción. Esto incluye, por ejemplo, determinar la actividad de unión específica de una fracción activa o evaluar la cantidad de polipéptidos de agente de unión específico dentro de una fracción mediante análisis de SDS/PAGE. Un método preferido para evaluar la pureza de una fracción de agente de unión específico es calcular la actividad de unión de la fracción, compararla con la actividad de unión del extracto inicial y así calcular el grado de purificación, evaluado en el presente documento mediante un “número de purificación en veces”. Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad de unión dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación y si la proteína o péptido de agente de unión específico expresado presenta o no una actividad de unión detectable.

20 Los expertos en la técnica conocerán bien diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas de agentes de unión específicos. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos (inmunoprecipitación) y similares o mediante desnaturalización térmica, seguido por centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía de afinidad (por ejemplo, proteína-A-Sepharose), intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, cromatografía de afinidad e hidroxilapatita; isoelectroenfoque; electroforesis en gel; y combinaciones de tales y otras técnicas. Tal como se conoce generalmente en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse, o que determinadas etapas pueden omitirse y todavía dar como resultado un método adecuado para la preparación de un agente de unión específico sustancialmente purificado.

30 No existe otro requisito general más que el agente de unión específico se proporcione siempre en su estado más purificado. De hecho, se contempla que productos de agentes de unión sustancialmente menos específicos tendrán utilidad en determinadas realizaciones. La purificación parcial puede lograrse usando menos etapas de purificación en combinación o utilizando formas diferentes del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC dará como resultado generalmente una mayor purificación “en veces” que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía a baja presión. Los métodos que presentan un bajo grado de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total de producto de proteína de agente de unión específico o en el mantenimiento de la actividad de unión de una proteína del agente de unión específico expresado.

40 Se sabe que la migración de un polipéptido puede variar, a veces significativamente, con diferentes condiciones de SDS/PAGE [Capaldi *et al.*, *Biochem Biophys Res Comm*, 76: 425 (1977)]. Por tanto, se apreciará que en condiciones de electroforesis que difieren, los pesos moleculares aparentes de productos de expresión de agentes de unión específicos purificados o parcialmente purificados puedan variar.

Ensayos de unión

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

50 Los ensayos de unión inmunológicos utilizan frecuentemente un agente de marcaje que señalará la existencia del complejo unido formado por el agente de captura y el antígeno. El agente de marcaje puede ser una de las moléculas que comprende el complejo de unión; es decir puede ser un agente de unión específico marcado o un anticuerpo anti-agente de unión específico marcado. Alternativamente, el agente de marcaje puede ser una tercera molécula, comúnmente otro anticuerpo, que se une al complejo unido. El agente de marcaje puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-agente de unión específico que lleva un marcador. El segundo anticuerpo, específico para el complejo unido, puede carecer de marcador, pero puede unirse al mismo una cuarta molécula específica para la especie de anticuerpos del que el segundo anticuerpo es un miembro. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, a la que entonces puede unirse una cuarta molécula, tal como estreptavidina marcada con enzima. Otras proteínas que pueden unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G pueden usarse también como agente de marcaje. Estas

proteínas de unión son constituyentes normales de las paredes celulares de bacterias estreptocócicas y presentan una reactividad no inmunogénica fuerte con regiones constantes de inmunoglobulina de una variedad de especies [véase, generalmente Akerstrom, Immunol, 135: 2589-2542 (1985) y Chaubert, Mod Pathol, 10: 585-591 (1997)].

5 A lo largo de los ensayos, pueden requerirse etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de desde aproximadamente 5 segundos hasta varias horas, preferiblemente desde aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, analito, volumen de disolución, concentraciones y similares. Habitualmente, los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque pueden realizarse a lo largo de un intervalo de temperaturas.

10 A. Ensayos de unión no competitiva:

Los ensayos de unión inmunológicos pueden ser del tipo no competitivo. Estos ensayos tienen una cantidad de analito capturado que se mide directamente. Por ejemplo, en un ensayo preferido de tipo "sandwich", el agente de captura (anticuerpo) puede unirse directamente a un sustrato sólido en el que se inmoviliza. Estos anticuerpos inmovilizados capturan entonces (se unen a) el antígeno presente en la muestra de prueba. La proteína así inmovilizada se une entonces a un agente de marcaje, tal como un segundo anticuerpo que tiene un marcador. En otro ensayo de tipo "sandwich" preferido, el segundo anticuerpo carece de marcador, pero al mismo puede unirse un anticuerpo marcado específico para anticuerpos de la especie de la que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo también puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, a la que puede unirse específicamente una tercera molécula marcada, tal como estreptavidina. [Véase, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988).

B. Ensayos de unión competitiva:

Los ensayos de unión inmunológicos pueden ser del tipo competitivo. La cantidad de analito presente en la muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de un analito añadido desplazado, o eliminado por competición, de un agente de captura por el analito presente en la muestra. En un ensayo de unión competitiva preferido, se añade a la muestra una cantidad conocida de analito, habitualmente marcado, y entonces la muestra se pone en contacto con un anticuerpo (el agente de captura). La cantidad de analito marcado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra. (Véase, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, págs. 579-583, citado anteriormente).

En otro ensayo de unión competitiva preferido, el anticuerpo se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La cantidad de proteína unida al anticuerpo puede determinarse o bien midiendo la cantidad de proteína presente en un complejo proteína/anticuerpo, o bien alternativamente midiendo la cantidad de proteína complejada restante. La cantidad de proteína puede detectarse proporcionando una proteína marcada. Véase, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, citado anteriormente).

Aún en otro ensayo de unión competitiva preferido, se utiliza inhibición de haptenos. En este caso, se inmoviliza un analito conocido sobre un sustrato sólido. Se añade una cantidad conocida de anticuerpo a la muestra y la muestra se pone en contacto con el analito inmovilizado. La cantidad de anticuerpo unido al analito inmovilizado es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. La cantidad de anticuerpo inmovilizado puede detectarse detectando o bien la fracción inmovilizada de anticuerpo o la fracción que permanece en disolución. La detección puede ser directa cuando el anticuerpo está marcado o indirecta mediante la adición posterior de un resto marcado que se une específicamente al anticuerpo tal como se describió anteriormente.

C. Utilización de ensayos de unión competitiva:

Los ensayos de unión competitiva pueden usarse para determinaciones de reactividad cruzada para permitir a un experto en la técnica determinar si un complejo de proteína o enzima que se reconoce por un agente de unión específico de la invención es la proteína deseada y no una molécula de reacción cruzada o para determinar si el anticuerpo es específico para el antígeno y no se une a antígenos no relacionados. En ensayos de este tipo, el antígeno puede inmovilizarse a un soporte sólido y se añade una mezcla de proteína no conocida al ensayo, que competirá con la unión de los agentes de unión específicos a la proteína inmovilizada. La molécula de competición también se une a uno o más antígenos no relacionados con el antígeno. La capacidad de las proteínas para competir con la unión de los anticuerpos de agentes de unión específicos al antígeno inmovilizado se compara con la unión por la misma proteína que se inmovilizó al soporte sólido para determinar la reactividad cruzada de la mezcla de proteínas.

D. Otros ensayos de unión:

La presente invención también proporciona métodos de inmunotransferencia de tipo Western para detectar o cuantificar la presencia de Ang-2 en una muestra. La técnica comprende generalmente separar proteínas de muestra mediante electroforesis en gel basándose en el peso molecular y transferir las proteínas a un soporte sólido adecuado, tal como filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o filtro de nailon derivatizado. La muestra se incuba con anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a Ang-2 y se detecta el complejo resultante.

Estos anticuerpos pueden marcarse directamente o alternativamente pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados que se unen específicamente al anticuerpo.

Los ensayos de unión para detectar los agentes de unión específicos de Ang-2 que alteran la unión de Ang-2 a su receptor se exponen en los ejemplos en el presente documento.

5 Ensayos de diagnóstico

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención son útiles para el diagnóstico de estados o enfermedades caracterizadas por la expresión de Ang-2 o subunidades, o en ensayos para monitorizar pacientes que están tratándose con inductores de Ang-2, sus fragmentos, agonistas o inhibidores de la actividad de Ang-2. Los ensayos de diagnóstico para Ang-2 incluyen métodos que utilizan un agente de unión específico y un marcador para
10 detectar Ang-2 en fluidos corporales humanos o extractos de células o tejidos. Los agentes de unión específicos de la presente invención pueden usarse con o sin modificación. En un ensayo de diagnóstico preferido, los agentes de unión específicos se marcarán uniendo, por ejemplo, un marcador o una molécula indicadora. Se conoce una amplia variedad de marcadores y moléculas indicadoras, algunos de los cuales ya se han descrito en el presente documento. En particular, la presente invención es útil para el diagnóstico de enfermedad humana.

15 Se conoce en la técnica una variedad de protocolos para medir proteínas Ang-2 usando anticuerpos o bien policlonales o bien monoclonales específicos para la proteína respectiva. Los ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales, de dos sitios utilizando anticuerpos monoclonales reactivos frente a dos epítomos que no interfieren en Ang-2, pero puede emplearse un
20 ensayo de unión competitiva. Estos ensayos se describen, por ejemplo, en Maddox *et al.*, J Exp Med, 158: 1211 [1983].

Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico, se establecen habitualmente valores normales o convencionales para la expresión de Ang-2 humana. Esta determinación puede lograrse combinando fluidos corporales o extractos celulares de sujetos normales, preferiblemente seres humanos, con un agente de unión
25 específico, por ejemplo, un anticuerpo, frente a Ang-2, en condiciones adecuadas para la formación de un complejo que se conocen bien en la técnica. La cantidad de formación de complejo convencional puede cuantificarse comparando la unión de los agentes de unión específicos a cantidades conocidas de proteína Ang-2, con muestras tanto control como de enfermedad. Entonces, los valores convencionales obtenidos de muestras normales pueden compararse con valores obtenidos de muestras de sujetos posiblemente afectados por la enfermedad. La desviación
30 entre valores convencionales y de sujetos sugiere un papel de Ang-2 en el estado patológico.

Para aplicaciones de diagnóstico, en determinadas realizaciones, los agentes de unión específicos se marcarán normalmente con un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que pueda producir, o bien directa o bien indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de
35 fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa del rábano [Bayer *et al.*, Meth Enz, 184: 138-163, (1990)].

Enfermedades

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a Ang-2 que es útil para el tratamiento de enfermedades y estados patológicos humanos. Pueden usarse agentes que modulan la actividad de unión a Ang-2, u otra actividad celular, en combinación con otros agentes terapéuticos para potenciar sus efectos terapéuticos o disminuir posibles
40 efectos secundarios.

En un aspecto, la presente invención proporciona reactivos y métodos útiles para tratar enfermedades y estados caracterizados por niveles no deseados o aberrantes de actividad de Ang-2 en una célula. Estas enfermedades incluyen cánceres y otros estados proliferativos, tales como hiperplasia, psoriasis, dermatitis de contacto, trastornos
45 inmunológicos y esterilidad.

La presente invención también proporciona anticuerpos para su uso en métodos de tratamiento del cáncer en un animal, incluyendo seres humanos, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de un agente de unión específico que inhibe o disminuye la actividad de Ang-2. La invención se refiere además a anticuerpos para su uso en métodos de inhibición del crecimiento de células cancerosas, incluyendo procesos de proliferación celular, invasividad y metástasis en sistemas biológicos. Los métodos incluyen el uso de un compuesto de la invención como
50 inhibidor del crecimiento de células cancerosas. Preferiblemente, los métodos se emplean para inhibir o reducir el crecimiento de células cancerosas, invasividad, metástasis o incidencia de tumores en animales vivos, tales como mamíferos. Los métodos de la descripción también pueden adaptarse fácilmente para su uso en sistemas de ensayo, por ejemplo, someter a ensayo el crecimiento de células cancerosas y propiedades de las mismas, así
55 como identificar compuestos que afectan al crecimiento de células cancerosas.

Los cánceres tratables mediante los métodos de la presente descripción se producen preferiblemente en mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos y otros primates, así como animales domésticos o de

compañía tales como perros y gatos, animales de laboratorio tales como ratas, ratones y conejos, y animales de granja tales como caballos, cerdos, ovejas y ganado.

Los tumores o neoplasmas incluyen crecimientos de células de tejido en los que la multiplicación de las células es incontrolada y progresiva. Algunos crecimientos de este tipo son benignos, pero otros se denominan malignos y pueden conducir a la muerte del organismo. Los neoplasmas o cánceres malignos se distinguen de crecimientos benignos porque, además de presentar proliferación celular agresiva, pueden invadir tejidos circundantes y metastatizarse. Además, los neoplasmas malignos se caracterizan porque muestran una mayor pérdida de diferenciación (mayor desdiferenciación) y de su organización en relación entre sí y sus tejidos circundantes. Esta propiedad también se denomina "anaplasia".

Las neoplasias tratables mediante la presente invención también incluyen tumores sólidos, es decir, carcinomas y sarcomas. Los carcinomas incluyen los neoplasmas malignos derivados de células epiteliales que infiltran (invaden) los tejidos circundantes y dan lugar a metástasis. Los adenocarcinomas son carcinomas derivados de tejido glandular, o que forman estructuras glandulares reconocibles. Otra categoría amplia de cánceres incluye sarcomas, que son tumores cuyas células están incrustadas en una sustancia fibrilar u homogénea como tejido conjuntivo embrionario. La invención también permite el tratamiento de cánceres de los sistemas mieloide o linfoide, incluyendo leucemias, linfomas y otros cánceres que no se presentan normalmente como una masa tumoral, sino que están distribuidos en los sistemas vasculares o linforreticulares.

El tipo de cáncer o células tumorales susceptibles al tratamiento según la invención incluyen, por ejemplo, tumor productor de ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de corteza suprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cáncer colorrectal, linfoma de células T cutáneo, cáncer endometrial, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (célula pequeña y no pequeña), efusión peritoneal maligna, efusión pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, glioma, linfoma de no Hodgkin, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de ovario (célula germinal), cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de próstata, retinoblastoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinomas de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, neoplasmas trofoblásticos, cáncer uterino, cáncer vaginal, cáncer de la vulva y tumor de Wilms.

La invención se ilustra particularmente en el presente documento en referencia al tratamiento de determinados tipos de cánceres definidos experimentalmente. En estos tratamientos ilustrativos, se ha usado modelos *in vivo* e *in vitro* del estado de la técnica convencionales. Estos métodos pueden usarse para identificar agentes que puede esperarse que sean eficaces en regímenes de tratamiento *in vivo*. Sin embargo, se entenderá que el método no se limita al tratamiento de estos tipos de tumores, sino que se extiende a cualquier tumor sólido derivado de cualquier sistema de órganos. Cánceres cuya invasividad o metástasis está asociada a la expresión o actividad de Ang-2 son especialmente susceptibles de inhibir o incluso inducir su regresión.

El método también puede ponerse en práctica incluyendo un agente de unión específico de la invención, tal como un anticuerpo, en combinación con otro agente quimioterápico anticancerígeno, tal como cualquier agente quimioterápico convencional. La combinación de un agente de unión específico con otros agentes de este tipo puede potenciar el protocolo quimioterápico. Numerosos protocolos quimioterápicos estarán presentes por sí mismos en la mente del médico experto como adecuados para su incorporación en el método. Puede usarse cualquier agente quimioterápico, incluyendo agentes alquilantes, antimetabolitos, hormonas y antagonistas, radioisótopos, así como productos naturales. Por ejemplo, el compuesto de la invención puede administrarse con antibióticos tales como doxorubicina y otros análogos de antraciclina, mostazas de nitrógeno tales como ciclofosfamida, análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo, cisplatino, hidroxurea, taxol y sus derivados naturales y sintéticos, y similares. Como otro ejemplo, en el caso de tumores mixtos, tales como adenocarcinoma de mama, en los que los tumores incluyen células dependientes de gonadotropina e independientes de gonadotropina, el compuesto puede administrarse conjuntamente con leuprolida o goserelina (análogos de péptido sintéticos de LH-RH). Otros protocolos antineoplásicos incluyen el uso de un compuesto de tetraciclina con otra modalidad de tratamiento, por ejemplo, cirugía, radiación, etc., también denominada en el presente documento "modalidades antineoplásicas adyuvantes". Por tanto, el método puede emplearse con tales regímenes convencionales con el beneficio de reducir los efectos secundarios y potenciar la eficacia.

Por tanto, la presente invención proporciona composiciones útiles para el tratamiento de una amplia variedad de cánceres, incluyendo tumores sólidos y leucemias. Los tipos de cáncer que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a: adenocarcinoma de mama, próstata, y colon; todas las formas de carcinoma broncogénico del pulmón; mieloides; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; branquioma; síndrome carcinoide maligno; enfermedad cardíaca carcinoide; carcinoma (por ejemplo, de Walker, de células basales, basoescamoso, de Brown-Pearce, ductal, de tumor de Ehrlich, de Krebs 2, de células de merkel, mucinoso, de pulmón de células no pequeñas, de células en avena, papilar, escirroso, bronquiolar, broncogénico, de células escamosas y de células transicionales); trastornos histiocíticos; leucemia; histiocitosis maligna; enfermedad de Hodgkin; carcinoma de células pulmonares pequeñas inmunoproliferativo; linfoma de no Hodgkin; plasmacitoma; reticuloendoteliosis; melanoma; condroblastoma; condroma; condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumores de células gigantes;

histiocitoma; lipoma; liposarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; cordoma; craneofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma; miosarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; tumor tofoblástico. Además, los siguientes tipos de cánceres también pueden tratarse: adenoma; colangioma; colesteatoma; ciclindroma; cistadenocarcinoma; cistadenoma; tumor de células granulosas; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumor de células de los islotes; tumor de células de Leydig; papiloma; tumor de células de Sertoli; tumor de células de la teca; leiomioma; leiomiosarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rabiomioma; rabiomiosarcoma; ependimoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitelioma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma no cromafínico; angioqueratoma; hiperplasia angioliñoide con eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatosis; glomangioma; hemangioendotelioma; hemangioma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; linfangioma; linfangiomioma; linfangiosarcoma; pinealoma; carcinosarcoma; condrosarcoma; cistosarcoma filoides; fibrosarcoma; hemangiosarcoma; leiomiosarcoma; leucosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; miosarcoma; mixosarcoma; carcinoma de ovario; rabiomiosarcoma; sarcoma; neoplasmas; neurofibromatosis y displasia cervical.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de los materiales de la presente invención para prevenir y/o tratar cualquier estado hiperproliferativo de la piel incluyendo psoriasis y dermatitis de contacto u otras enfermedades hiperproliferativas. Se ha demostrado que pacientes con psoriasis y dermatitis de contacto tienen actividad de Ang-2 elevada dentro de estas lesiones [Ogoshi *et al.*, J. Inv. Dermatol., 110: 818-23 (1998)]. Preferiblemente, los agentes de unión específicos, específicos para Ang-2, se usarán en combinación con otros agentes farmacéuticos para tratar a seres humanos que expresan estos síntomas clínicos. Los agentes de unión específicos pueden administrarse usando cualquiera de los diversos portadores a través de vías de administración descritas en el presente documento y otras que conocen bien los expertos en la técnica.

Otros aspectos de la presente descripción incluyen tratar diversas retinopatías (incluyendo retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad) en las que participa la angiogénesis, así como trastornos/enfermedades del aparato reproductor femenino tal como endometriosis, fibromas uterinos y otros estados de este tipo asociados con proliferación vascular disfuncional (incluyendo crecimiento microvascular endometrial) durante el ciclo reproductor femenino.

Todavía otra aspecto de la presente descripción se refiere al tratamiento del crecimiento vascular anómalo incluyendo malformaciones arteriovenosas cerebrales (AVM), lesión y reparación de la mucosa gastrointestinal, ulceración de la mucosa gástrica en pacientes con una historia de enfermedad de úlcera péptica, incluyendo isquemia resultante de accidente cerebrovascular, un amplio espectro de trastornos vasculares pulmonares en enfermedad hepática e hipertensión portal en pacientes con hipertensión portal no hepática.

Otro aspecto de la presente descripción es la prevención de cánceres utilizando las composiciones proporcionadas por la presente invención. Tales reactivos incluirán agentes de unión específicos contra Ang-2.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de agentes de unión específicos de Ang-2 están dentro del alcance de la presente invención. Se describen en detalle composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.171.586, concedida a Lam *et al.*, expedida el 9 de enero de 2001. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un agente de unión específico, tal como un anticuerpo, o un fragmento, variante, derivado o fusión del mismo tal como se describe en el presente documento, en mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden agentes de unión específicos antagonistas que modulan parcial o completamente al menos una actividad biológica de Ang-2 en mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable. Normalmente, los agentes de unión específicos estarán suficientemente purificados para su administración a un animal.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina), agentes quelantes [tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)]; agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes; aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; agentes tensioactivos o humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbato tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales

alcalinos (preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

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

10 El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza o bien acuosa o bien no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos a modo de ejemplo adicionales. Otras composiciones farmacéuticas a modo de ejemplo comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5 o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que por tanto pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado. En una realización de la presente invención, las composiciones de agente de unión pueden prepararse para su almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, el producto de agente de unión puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden seleccionarse para administración parenteral. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración enteral tal como por vía oral, por vía auditiva, por vía oftálmica, por vía rectal o por vía vaginal. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la experiencia de la técnica.

25 Los componentes de formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a pH ligeramente bajo, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

30 Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en esta invención pueden estar en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral libre de pirógenos, que comprende el agente de unión específico deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula un agente de unión como una disolución estéril, isotónica, apropiadamente conservada. Aún otra preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), perlas o liposomas, que proporciona la liberación controlada o sostenida del producto que entonces puede administrarse mediante una inyección de depósito. También puede usarse ácido hialurónico, y esto puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración de fármacos implantables.

40 En otro aspecto, las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de ringer o solución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. 45 También pueden usarse para la administración polímeros de amino policatiónicos no lipídicos. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

50 En otra realización, una composición farmacéutica puede formularse para inhalación. Por ejemplo, un agente de unión puede formularse como un polvo seco para inhalación. También pueden formularse disoluciones de inhalación de moléculas de ácido nucleico o polipéptido con un propelente para administración de aerosol. Aún en otra realización, las disoluciones pueden nebulizarse. Se describe adicionalmente la administración pulmonar en la solicitud PCT n.º PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

55 También se contempla que determinadas formulaciones puedan administrarse por vía oral. En una realización de la presente invención, las moléculas de agente de unión que se administran de esta manera pueden formularse con o sin los portadores usados habitualmente en la composición de formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tubo digestivo en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación pre-sistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula de agente de unión. También pueden

emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

También pueden formularse composiciones farmacéuticas para administración oral usando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para administración oral.

5 Tales portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para su ingestión por el paciente.

10 Pueden obtenerse preparaciones farmacéuticas para uso oral a través de la combinación de compuestos activos con excipiente sólido y el procesamiento de la mezcla resultante de gránulos (opcionalmente, tras molienda) para obtener comprimidos o núcleos de comprimidos. Pueden añadirse componentes auxiliares adecuados, si se desea. Los excipientes adecuados incluyen cargas de hidratos de carbono o proteínas, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa, tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; gomas, incluyendo arábica y tragacanto; y proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes o solubilizantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar y ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

15 Pueden usarse núcleos de comprimidos conjuntamente con recubrimientos adecuados, tales como disoluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de comprimidos recubiertos de azúcar para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosificación.

20 Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral también incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un recubrimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener principios activos mezclados con cargas o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquido o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

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

30 Resultarán evidentes composiciones farmacéuticas adicionales para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican moléculas de agentes de unión en formulaciones de administración sostenida o controlada. Los expertos en la técnica conocen también técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase por ejemplo, el documento PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (documentos U.S. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato [Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)], poli(2-hidroxietil-metacrilato) [Langer *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 15: 167-277, (1981)] y [Langer *et al.*, *Chem Tech*, 12: 98-105 (1982)], etilenoacetato de vinilo (Langer *et al.*, citado anteriormente) o poli(ácido D(-)-3-hidroxibutírico) (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también incluyen liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, Eppstein *et al.*, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 82: 3688-3692 (1985); documento EP 36.676; documento EP 88.046; documento EP 143.949.

35 Normalmente, la composición farmacéutica que va a usarse para administración *in vivo* debe ser estéril. Esto puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede realizarse o bien antes de o bien tras la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en disolución. Además, las composiciones parenterales se colocan generalmente en un envase que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

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

En una realización específica, la presente invención se refiere a kits para producir una unidad de administración de una única dosis. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer envase que tiene una proteína desecada como un segundo envase que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta invención kits que contienen jeringuillas precargadas de múltiples cámaras o una única cámara (por ejemplo, jeringuillas para líquido y liojeringuillas).

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

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente o bien en ensayos de cultivo celular o bien en modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, perros o cerdos. Un modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Tal información puede usarse entonces para determinar dosis útiles y vías para administración en seres humanos.

La dosificación exacta se determinará en vista de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del compuesto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, el tiempo y la frecuencia de administración, la(s) combinación(es) de fármacos, las sensibilidades de reacción y la respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de larga actuación pueden administrarse cada de 3 a 4 días, cada semana, o bisemanalmente dependiendo de la vida media y tasa de aclaramiento de la formulación particular.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de agente de unión en la formulación usada. Normalmente, una composición se administra hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. La composición puede administrarse por tanto como una dosis individual, o como dosis múltiples (a concentraciones/dosificaciones iguales o diferentes) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua. Se hace de manera rutinaria un refinamiento adicional de la dosificación apropiada. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse a través del uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

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

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

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

En otros casos, un agente de unión que es un polipéptido puede administrarse mediante la implantación de determinadas células que se han modificado mediante ingeniería genética, usando métodos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar el polipéptido. Tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Opcionalmente, las células pueden inmortalizarse. Con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación normalmente son recintos o membranas poliméricas, semipermeables, biocompatibles, que permiten la liberación del/de los producto(s) de proteína pero impiden la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

Terapia de combinación

Pueden utilizarse agentes de unión específicos de la invención en combinación con otros agentes terapéuticos en el

tratamiento de patologías de Ang-2. Estos otros agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo tratamiento con radiación, agentes quimioterápicos, así como otros factores de crecimiento.

El tratamiento con quimioterapia puede emplear agentes antineoplásicos incluyendo, por ejemplo, agentes alquilantes incluyendo: mostazas de nitrógeno, tales como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y clorambucilo; nitrosoureas, tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (metil-CCNU); etileniminas/metilmelamina tal como trietilenmelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametilmelamina (HMM, altretamina); sulfonatos de alquilo tales como busulfano; triazinas tales como dacarbazina (DTIC); antimetabolitos incluyendo análogos de ácido fólico tales como metotrexato y trimetrexato, análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, gemcitabina, arabinósido de citosina (AraC, citarabina), 5-azacitidina, 2,2'-difluorodesoxicidina, análogos de purina tales como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA); productos naturales incluyendo fármacos antimitóticos tales como paclitaxel, alcaloides de la vinca incluyendo vinblastina (VLB), vincristina y vinorelbina, taxotere, estramustina y fosfato de estramustina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como actimomicina D, daunomicina (rubidomicina), doxorubicina, mitoxantrona, idarubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C y actinomicina; enzimas tales como L-asparaginasa; modificadores de la respuesta biológica tales como interferón-alfa, IL-2, G-CSF y GM-CSF; agentes misceláneos incluyendo complejos de coordinación de platino tales como cisplatino y carboplatino, antracenediones tales como mitoxantrona, urea sustituida tal como hidroxiourea, derivados de metilhidrazina incluyendo N-metilhidrazina (MIH) y procarbazona, supresores suprarrenales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas incluyendo antagonistas de adrenocorticosteroides tales como prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; progestina tal como caproato de hidroxiprogestero, acetato de medroxiprogestero y acetato de megestrol; estrógeno tal como dietilestilbestrol y equivalentes de etinilestradiol; antiestrógeno tal como tamoxifeno; andrógenos incluyendo propionato de testosterona y fluoximesterona/equivalentes; antiandrógenos tales como flutamida, análogos de hormona liberadora de gonadotropina y leuprolida; y antiandrógenos no esteroideos tales como flutamida.

La terapia de combinación con factores de crecimiento puede incluir citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombotopoyetina, factor de células madre y eritropoyetina. Otras composiciones pueden incluir angiopoyetinas conocidas, por ejemplo Ang-1, 2, 4, Y, y/o el polipéptido similar a Ang humana, y/o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los factores de crecimiento incluyen angiogenina, proteína-1 morfogenética ósea, proteína-2 morfogenética ósea, proteína-3 morfogenética ósea, proteína-4 morfogenética ósea, proteína-5 morfogenética ósea, proteína-6 morfogenética ósea, proteína-7 morfogenética ósea, proteína-8 morfogenética ósea, proteína-9 morfogenética ósea, proteína-10 morfogenética ósea, proteína-11 morfogenética ósea, proteína-12 morfogenética ósea, proteína-13 morfogenética ósea, proteína-14 morfogenética ósea, proteína-15 morfogenética ósea, receptor IA de proteína morfogenética ósea, receptor IB de proteína morfogenética ósea, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, factor-1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor-2 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor-2 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor de crecimiento de células endoteliales, endotelina-1, factor de crecimiento epidérmico, atrayente de neutrófilos derivado del epitelio, factor-4 de crecimiento de fibroblastos, factor-5 de crecimiento de fibroblastos, factor-6 de crecimiento de fibroblastos, factor-7 de crecimiento de fibroblastos, factor-8 de crecimiento de fibroblastos, factor-8b de crecimiento de fibroblastos, factor-8c de crecimiento de fibroblastos, factor-9 de crecimiento de fibroblastos, factor-10 de crecimiento de fibroblastos, factor ácido de crecimiento de fibroblastos, factor básico de crecimiento de fibroblastos, receptor-1 de factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales, receptor-2 de factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales, proteína relacionada con crecimiento, proteína-2 relacionada con crecimiento, proteína-3 relacionada con crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor I de crecimiento similar a la insulina, receptor de factor de crecimiento similar a la insulina, factor II de crecimiento similar a la insulina, proteína de unión a factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor-1 de factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neurotrofina-3, neurotrofina-4, factor de crecimiento de la placenta, factor-2 de crecimiento de la placenta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de las plaquetas, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, cadena A del factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de las plaquetas, factor AB de crecimiento derivado de las plaquetas, cadena B del factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor BB de crecimiento derivado de las plaquetas, receptor-1 de factor de crecimiento derivado de las plaquetas, receptor-2 de factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de estimulación del crecimiento de células pre-B, factor de células madre, receptor de factor de células madre, factor-1 de crecimiento transformante, factor-2 de crecimiento transformante, factor-3 de crecimiento transformante, factor-1,2 de crecimiento transformante, factor-4 de crecimiento transformante, factor-5 de crecimiento transformante, proteína I de unión a factor de crecimiento transformante, proteína II de unión a factor de crecimiento transformante, proteína III de unión a factor de crecimiento transformante, receptor de factor de necrosis de tumor tipo I, receptor de factor de necrosis de tumor tipo II, receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa, factor de crecimiento endotelial vascular y proteínas quiméricas y fragmentos biológica o inmunológicamente activos de los mismos.

Inmunoterapia

La inmunoterapia se basa generalmente en el uso de células efectoras inmunitarias y moléculas para seleccionar y destruir células cancerosas. Los efectores inmunitarios pueden ser, por ejemplo un anticuerpo de la presente invención que reconoce algún marcador en la superficie de una célula diana. El anticuerpo solo puede servir como efector de terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente la destrucción celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o una toxina (quimioterápico, radionúclido, de cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina pertussis, etc.) y por tanto puede servir simplemente como agente de direccionamiento.

Según la presente invención, pueden seleccionarse como diana formas mutantes de Ang-2 mediante inmunoterapia con o bien anticuerpos o bien conjugados de anticuerpo de la invención. Se contempla particularmente que las composiciones de anticuerpo de la invención puedan usarse en un enfoque de terapia combinada conjuntamente con terapia dirigida a Ang-2.

La inmunoterapia pasiva ha demostrado ser particularmente eficaz contra varios cánceres. Véase, por ejemplo, el documento WO 98/39027.

Los siguientes ejemplos están destinados a fines de ilustración sólo, y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención de ningún modo.

Ejemplo 1

Expresión de Ang-2 en tejido normal y patológico

Se examinó la expresión de Ang-2 en tejido normal y patológico usando hibridación *in situ*. Se amplificaron fragmentos de las secuencias de Ang-2 humana (número de registro de Genbank: AF004327, nucleótidos 1274-1726) y murina (número de registro de Genbank: AF004326, nucleótidos 1135-1588) mediante PCR con transcriptasa inversa de ADNc de pulmón fetal humano o murino, se clonaron en el plásmido pGEM-T y se verificaron mediante secuenciación. Se transcribieron sondas de ARN antisentido marcadas con ³³P a partir de moldes de plásmido linealizado usando ³³P-UTP y ARN polimerasa. Se cortaron bloques de tejidos fijados con formaldehído, incrustados en parafina, a 5 µm y se recogieron en portaobjetos cargados. Antes de la hibridación *in situ*, se permeabilizaron los tejidos con HCl 0,2 M, seguido por digestión con proteinasa K y acetilación con trietanolamina y anhídrido acético. Se hibridaron secciones con la sonda radiomarcada durante la noche a 55°C, luego se sometieron a digestión con ARNasa y un lavado de alta rigurosidad en aproximadamente 0,1X SSC a 55°C. Se sumergieron los portaobjetos en emulsión NTB2 de Kodak, se expusieron a 4°C durante 2-3 semanas, se revelaron y se contratiñeron. Se examinaron las secciones con campo oscuro y con iluminación convencional para permitir la evaluación simultánea de morfología de tejido y señal de hibridación.

Los resultados indicaron que en el ser humano posnatal normal, la expresión de Ang-2 se restringe a los pocos tejidos que contienen vasculatura angiogénica, tales como el ovario, la placenta y el útero. No se detectó expresión de Ang-2 en el corazón, cerebro, riñón, hígado, pulmón, páncreas, bazo, músculo, amígdala, timo, apéndice, ganglio linfático, vesícula biliar, próstata o testículo de ser humano adulto normal. En ratón de cinco semanas de edad (pero no en ser humano o mono adulto), los riñones mostraron expresión de Ang-2 prominente en los vasos rectos. Para determinar si esta expresión era un resto de desarrollo embrionario, se repitió este experimento en riñones derivados de ratones cuya edad oscilaba hasta un año de edad usando la sonda de Ang-2 murina y las condiciones descritas anteriormente. Se observó que la expresión de Ang-2 disminuía durante el desarrollo posnatal, pero todavía era evidente en riñones de ratones de un año de edad.

También se detectó la expresión de Ang-2 prácticamente en todos los tipos de tumores sometidos a prueba, incluyendo tumores humanos primarios tales como carcinoma de colon (5 casos), carcinoma de mama (10 casos), carcinoma de pulmón (8 casos), glioblastoma (1 caso), tumores humanos metastásicos tales como carcinoma de mama (2 casos), carcinoma de pulmón (2 casos) y carcinoma de ovario (2 casos) que se habían metastatizado al cerebro y modelos de tumor de roedor tales como C6 (glioma de rata), HT29 (carcinoma de colon humano), Colo-205 (carcinoma de colon humano), HCT116 (carcinoma de colon humano), A431 (carcinoma epidermoide humano), A673 (rabdomyosarcoma humano), HT1080 (fibrosarcoma humano), PC-3 (carcinoma de próstata humano), B16F10 (melanoma murino), MethA (sarcoma murino) y metástasis de carcinoma de pulmón Lewis. Adicionalmente, se detectó la expresión de Ang-2 en neovasos que crecían en un coágulo de Matrigel en respuesta a VEGF y en un modelo de hipoxia de ratón de retinopatía de premadurez.

Ejemplo 2

Producción de proteína mAng-2 recombinante y antisuero anti-Ang-2 policlonal de conejo

Se obtuvo ADNc de Ang-2 murino etiquetado con His de longitud completa mediante PCR (kit de PCR Clontech Advantage, n.º de cat. K1905-01) a partir de una biblioteca de ADNc de embrión murino de 15 días (Marathon-Ready-cDNA, n.º de cat. 7459-1, Clontech, Inc.) usando cebadores de PCR para Ang-2 humana de longitud completa. Se ligó el producto de PCR en un vector de expresión de promotor de CMV y se transfectó el plásmido resultante en células de fibrosarcoma humano HT1080 (obtenidas de ATCC) usando reactivo de transfección

FuGENE6 (Roche, n.º de cat. 1814443). Se aislaron clones estables mediante selección de G418. Se usaron ELISA anti-etiqueta de His e inmunotransferencia tipo Western para seleccionar clones de expresión mAng-2-his.

Se purificó el polipéptido de mAng-2 recombinante a partir de medios condicionados (C.M.) de estas células. Se purificaron los C.M. que contenían mAng-2-His mediante un protocolo de cromatografía de dos etapas. En resumen, se valoraron los medios condicionados a pH 8,9 añadiendo tampón Tris pH 9,5 hasta una concentración final de aproximadamente 20 mM. Adicionalmente, se añadió el detergente CHAPS hasta una concentración final de aproximadamente 5 mM. Luego se aplicaron los C.M. directamente a una columna de intercambio aniónico Q-Sepharose ff (Pharmacia). Luego se lavó la columna con Tris aproximadamente 10 mM, pH 8,0 que contenía NaCl aproximadamente 50 mM. Se eluyó mAng-2-His recombinante en una única etapa usando Tris 10 mM pH 8,0 que contenía NaCl aproximadamente 350 mM y CHAPS aproximadamente 5 mM.

Se ajustó el eluato de la columna de Q-Sepharose hasta imidazol aproximadamente 4 mM y se aplicó a una columna de afinidad de metal inmovilizado (superflujo de Ni-NTA [Qiagen]). Se eluyó la proteína unida con PBS que contenía CHAPS aproximadamente 5 mM e imidazol aproximadamente 100 mM. Luego se concentró el eluato hasta aproximadamente 1,0 mg/ml, seguido por diálisis contra PBS. La pureza de mAng-2-His fue mayor que el 90 por ciento tal como se mide mediante tinción con Coomassie SDS-PAGE.

Se inmunizaron conejos con aproximadamente 0,2 mg de mAng-2/inyección en un intento por producir anticuerpos. Se inyectaron los conejos con aproximadamente 1 ml de Hunter's TiterMax® (Sigma) y mAng-2 a una razón de 1:1. Cuatro semanas después, cada conejo recibió una inyección repetida o de refuerzo; dos semanas después de eso, recibieron su siguiente refuerzo, y en la semana siete, se extrajeron los sueros y se evaluaron para determinar el título contra mAng-2. Si el título del suero era alto, se extrajeron sangrados de producción de 50 ml por semana durante seis semanas consecutivas. Sin embargo, si el título del suero era bajo, se administró a los conejos un refuerzo adicional, y se extrajeron sangrados de producción de 50 ml por semana durante seis semanas consecutivas, empezando en la semana 9. Después de seis sangrados de producción consecutivos, se permitió que los conejos descansaran durante seis semanas. Si se requerían más sueros, se administraron refuerzos a los conejos otra vez un mes después del último sangrado de producción.

Usando el ELISA de neutralización (descrito más adelante), se observó que los antisueros policlonales de conejo anti-mAng-2 de dos conejos, 5254 y 5255, neutralizaron la interacción mAng-2:Tie2.

Ejemplo 3

Ensayos moleculares para evaluar anticuerpos frente a Ang-2

Se desarrollaron ensayos moleculares (ELISA de afinidad, ELISA de neutralización y BIAcore) para evaluar la unión de anticuerpo directo a Ang-2 y miembros de la familia relacionados y el efecto de anticuerpos sobre la interacción Ang-2:Tie2. Estos ensayos *in vitro* y basados en células se describen tal como sigue.

A. ELISA de afinidad

Para la selección inicial de anticuerpos anti-Ang-2 candidatos, se usaron polipéptido de Ang-2 humana purificada (R and D Systems, Inc; número de catálogo 623-AN; Ang-2 se proporciona como una mezcla de 2 versiones truncadas) o Ang-2 murina (preparado tal como se describió anteriormente). Para ensayos de unión de confirmación, se obtuvo Ang-2 humana a partir de medios condicionados de células 293T humanas transfectadas con ADN de Ang-2 humana de longitud completa y se cultivó en DMEM libre de suero que contenía aproximadamente 50 microgramos por ml de albúmina de suero bovino (BSA).

Usando placas de microtitulación, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de Ang-2 a cada pocillo y se incubaron las placas aproximadamente 2 horas, después de lo cual se lavaron las placas cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween-20 aproximadamente al 0,1 por ciento. Luego se bloquearon los pocillos usando aproximadamente 250 microlitros por pocillo de BSA aproximadamente al 5 por ciento en PBS, y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Tras la incubación, se descartó el exceso de disolución de bloqueo, y se añadieron aproximadamente 100 microlitros de anticuerpo anti-Ang-2 candidato a cada pocillo en una serie de dilución comenzando a una concentración de aproximadamente 40 nanomolar y luego diluyendo en serie 4 veces en PBS que contenía BSA aproximadamente al 1 por ciento. Luego se incubaron las placas durante la noche a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavaron las placas con PBS que contenía Tween-20 aproximadamente al 0,1 por ciento. Se repitió el lavado cuatro veces adicionales, después de lo cual se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG(Fc)-HRP de cabra anti-humana (Pierce Chemical Co., n.º de catálogo 31416) previamente diluida 1:5000 en PBS que contenía BSA (albúmina de suero bovino) al 1 por ciento. Se incubaron las placas aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavaron las placas cinco veces en PBS que contenía Tween-20 aproximadamente al 0,1 por ciento, después de lo cual se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato de TMB (sistema de sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina; Sigma chemical Company, St. Louis, MO, número de catálogo T8665) y se incubaron las placas aproximadamente de 5-15 minutos hasta que se desarrolló un color azul. Luego se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a aproximadamente 370 nm.

B. ELISA de neutralización

Se prepararon placas de microtitulación a las que se unió polipéptido de Ang-2 humana tal como se describió para el ELISA de afinidad. Se prepararon anticuerpos anti-Ang-2 candidatos en diluciones en serie tal como se describió para el ELISA de afinidad anterior en una disolución de PBS que contenía BSA aproximadamente al 1 por ciento y Tie2 aproximadamente 1 nM (proporcionado como una molécula de Tie2-Fc en la que la parte de Tie2 sólo contiene la parte extracelular soluble de la molécula; R and D Systems, número de catálogo 313-TI). Después de añadir aproximadamente 100 microlitros de la disolución de anticuerpo/Tie2 a cada pocillo, se incubaron las placas durante la noche a temperatura ambiente, y luego se lavaron cinco veces en PBS que contenía Tween-20 aproximadamente al 0,1 por ciento. Tras el lavado, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de anticuerpo anti-Tie2 (Pharmingen Inc., n.º de catálogo 557039) hasta una concentración final de aproximadamente 1 microgramo por ml y las placas se incubaron aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG-HRP de cabra anti-ratón (Pierce Chemical CO., n.º de catálogo 31432) a una dilución de 1:10.000 en PBS que contenía BSA aproximadamente al 1 por ciento. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, después de lo cual se lavaron cinco veces con PBS que contenía Tween-20 aproximadamente al 0,1 por ciento. Luego se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato de TMB (descrito anteriormente) y se permitió que se desarrollara color. Luego se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 370 nm.

C. BIAcore de afinidad

Se llevó a cabo un análisis de afinidad de cada anticuerpo frente a Ang-2 candidato en un instrumento BIAcore®2000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) con PBS y tensioactivo P20 al 0,005 por ciento (Biacore, Inc.) como tampón de corrida. Se inmovilizó proteína G recombinante (Repligen, Needham, MA) a un chip de sensor CM5 de calidad de investigación (Biacore, Inc.) mediante grupos amina primaria usando el kit de acoplamiento de amina (Biacore, Inc.) según el protocolo sugerido por el fabricante.

Se llevaron a cabo ensayos de unión uniendo en primer lugar aproximadamente 100 Ru de cada anticuerpo anti-Ang-2 candidato a la proteína G inmovilizada, después de lo cual se inyectaron entonces diversas concentraciones (0-100 nM) de huAng-2 o mAng-2 sobre la superficie del anticuerpo unido a una velocidad de flujo de aproximadamente 50 ul/min durante aproximadamente 3 minutos. Se determinó la cinética de unión de anticuerpo incluyendo k_a (constante de velocidad de asociación), k_d (constante de velocidad de disociación) y K_D (constante de equilibrio de disociación) usando el programa informático BIA evaluation 3.1 (Biacore, Inc.). Constantes de equilibrio de disociación inferiores indicaron mayor afinidad del anticuerpo por Ang-2.

Ejemplo 4

Producción de anticuerpos frente a Ang-2 completamente humanos mediante presentación en fago

Se generaron anticuerpos frente a Ang-2 completamente humanos mediante cribado de una biblioteca de Fab de presentación en fago de Target Quest (Target Quest, Inc.) frente a un polipéptido de Ang-2 humano (R and D Systems Inc., catálogo 623-AN), según el siguiente protocolo.

Se inmovilizó Ang-2 humana sobre la superficie de perlas magnéticas de poliestireno mediante dos métodos: (1) recubrimiento directo de Ang-2 a 50 ug/ml a 4°C durante la noche; y (2) captura indirecta de Ang-2 mediante anticuerpo de cabra anti-Ang-2 a 50 ug/ml a 4°C durante la noche. Se bloqueó la superficie de las perlas mediante el 2% de leche en PBS (MPBS). Se seleccionó previamente la biblioteca de fago Fab humano para eliminar clones de fago reactivos a perlas magnéticas sin recubrimiento o el anticuerpo de cabra anti-Ang-2. Luego se incubaron perlas magnéticas recubiertas con Ang-2 con fago de biblioteca a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Tras la etapa de unión a fago, se lavó la superficie 6 veces con MPBS que contenía Tween 20 aproximadamente al 0,1 por ciento, seguido por lavado 6 veces con PBS que contenía Tween 20 aproximadamente al 0,1 por ciento, seguido por 2 veces con PBS. Primero se eluyó el fago unido con aproximadamente 100 ug/ml de Tie2-Fc humano (R and D Systems, Minneapolis, MN), y luego con trietanolamina aproximadamente 100 mM. Se infectaron los fagos eluidos en células TG1 de *E. coli*, se amplificaron y se rescataron para la siguiente ronda de selección. Se aumentó la presión de selección en rondas sucesivas incorporando lavados más astringentes y reduciendo el número de fago de entrada. Después de 3 rondas de selección, se identificaron 18 clones únicos de Fab de unión a Ang-2, de los que prácticamente todos reconocieron Ang-2 humana, Ang-2 de ratón y Ang-2 de rata tal como se mide usando el ensayo de afinidad de ELISA descrito anteriormente. Aproximadamente el diez por ciento de estos fagos también se unían a Ang-1 humana. Se convirtieron estos clones en anticuerpos de IgG1 tal como se describe a continuación.

Para obtener fagos únicos adicionales, se llevó a cabo una segunda ronda de selección usando la misma biblioteca pero un protocolo ligeramente diferente. En este protocolo, se sembró Ang-2 humana en tampón NaHCO₃ a pH 9,6 en inmunotubos Nunc maxisorp a aproximadamente 4°C durante la noche. Se sembró Ang-2 a aproximadamente 1,5, 0,74 y 0,3 ug/ml para rondas de cribado 1, 2 y 3, respectivamente. Se bloqueó la superficie de inmunotubos usando leche aproximadamente al 2 por ciento en PBS (MPBS), antes de incubarse con aproximadamente 2 trillones de partículas de fago (aproximadamente 50 copias de cada fago único en la biblioteca) de la misma biblioteca de presentación en fago mencionada anteriormente (Target Quest) en aproximadamente 4 ml de MPBS al

2%. Tras la etapa de incubación de fago, se lavó la superficie 20 veces con PBS más Tween 20 aproximadamente al 0,1 por ciento, seguido por 20 veces con PBS. Se eluyó el fago unido usando hAng-2 1 μ M o Tie2 humano 1 μ M (R and D Systems, descritos anteriormente). Se infectaron fagos eluidos en células TGI de *E. coli* (proporcionadas con la biblioteca de fago), se amplificaron y se rescataron para la siguiente ronda de selección. Se identificaron dieciséis clones únicos Fab de unión a Ang-2 mediante amplificación por PCR de todos los fagos a los que se une hAng-2 o Tie2 y se analizaron estos clones mediante digestión por restricción. Se secuenció el ADN de cada clon.

Se amplificó la secuencia que codificaba para la región variable de cada cadena pesada de cada fago con cebadores complementarios. Se diseñaron los cebadores para incorporar un sitio HindIII, sitio XbaI, secuencia Kozak y una secuencia señal (el péptido traducido es MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC; SEQ ID NO: 69) en el extremo 5' de la región variable, mientras que se añadió un sitio BsmBI en el extremo 3' del producto de PCR. Como ejemplo de cómo se clonaron las cadenas pesadas, se amplificó el ADN molde del fago para el clon 544 (SEQ ID NO 19) usando cebadores 2248-21 (GTG GTT GAG AGG TGC CAG ATG TCA GGT CCA GCT GGT GCA G; SEQ ID NO: 70) que añadió los últimos 7 aminoácidos de la secuencia señal y 2502-31 (ATT ACG TCT CAC AGT TCG TTT GAT CTC CAC; SEQ ID NO: 71) que añadió el sitio BsmBI en el extremo de la región variable. Se amplificó el producto resultante mediante cebadores 2148-98 (CCG CTC AGC TCC TGG GGC TCC TGC TAT TGT GGT TGA GAG GTG CCA GAT; SEQ ID NO: 72) que añadió nueve aminoácidos al péptido señal (AQLLGLLLL; SEQ ID NO: 73) y 2502-31, y luego 2489-36 (CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA CAT GAG GGT CCC CGC TCA GCT CCT GGG; SEQ ID NO: 74) y 2502-31. El cebador 2489-36 añadió, desde 5' hasta 3', el sitio HindIII, sitio XbaI, secuencia Kozak y los primeros 6 aminoácidos de la secuencia señal. Se digirieron los productos de PCR con XbaI y BsmBI, y luego se clonaron en un vector de expresión de mamífero que contenía la región constante de IgG1 humana. Este vector contiene un promotor de SV40 y selección de DHFR.

Las cadenas ligeras de cada fago fueron de clase o bien kappa o bien lambda. Para cada cadena ligera, se diseñaron cebadores complementarios para añadir, desde 5' hasta 3', un sitio HindIII, un sitio XbaI, secuencia Kozak y secuencia señal (expuesta anteriormente). Se clonaron las cadenas que tenían regiones codificantes libres de error como productos de longitud completa. Como un ejemplo, se amplificó la cadena ligera del clon de fago 536 (SEQ ID NO: 11) como una región codificante de longitud completa usando los cebadores 2627-69 (GTG GTT GAG AGG TGC CAG ATG TGA CAT TGT GAT GAC TCA GTC TCC; SEQ ID NO: 75), que añadió los últimos siete aminoácidos de la secuencia señal y cebador 2458-54 (CTT GTC GAC TTA TTA ACA CTC TCC CCT GTT G; SEQ ID NO: 76), que añadió un sitio Sall después del codón de parada. Luego se amplificó este producto de PCR tal como se mencionó anteriormente con cebadores 5' adicionales, 2148-98 y 2489-36 respectivamente, emparejados con el cebador 2458-54, para terminar la adición de la secuencia señal y sitios de clonación. Se clonaron las cadenas ligeras de longitud completa como fragmentos de XbaI-Sall en el vector de expresión de mamífero descrito anteriormente.

Determinados clones lambda tenían errores en sus regiones constantes en comparación con la secuencia de región constante humana natural. Para corregir estas discrepancias, se llevó a cabo una PCR de solapamiento usando ADN que codificaba para una región constante lambda perfecta y la región variable derivada de fago. También se clonaron estos clones como fragmentos de XbaI-Sall tal como se describió anteriormente.

Cuando se clonaron regiones variables kappa por separado de sus regiones constantes, se añadió un sitio BsmBI al extremo 3' del producto de PCR. Tras la digestión del producto de PCR con XbaI y BsmBI, se clonó la región variable de cadena kappa en un vector de expresión que contenía la región constante kappa humana.

Se cotransfectaron los constructos de cadena pesada y ligera emparejados de cada fago convertido en células CHO usando el kit de transfección de fosfato de calcio (Invitrogen Corp.) generalmente según el protocolo sugerido por el fabricante. Se cambiaron los medios 14-16 horas tras la transfección y se sometieron las células a pases a placas de cultivo tisular para la selección tras aproximadamente 48 horas según las recomendaciones del fabricante. Se aislaron las células transfectadas mediante selección de HT durante aproximadamente 3 semanas, momento en el cual se tripsinizaron las colonias de células CHO transfectadas y se combinaron en una "combinación" de células transfectadas.

Se recogieron medios condicionados a pequeña escala después de 48 horas y se sometieron a ensayo para determinar la producción de anticuerpo mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo anti-Fc humano, anticuerpo anti-kappa humana o anticuerpo anti-lambda humana. Luego se sometieron a pase las poblaciones celulares seleccionadas con presión selectiva usando técnica estéril de cultivo tisular convencional hasta que se obtuvieron suficientes células para sembrar cuatro frascos rotativos de 850 cm² con 2x10⁷ células viables cada uno, y para preparar líneas celulares de reserva congeladas usando DMSO. Después de la siembra, se mantuvieron las células en frascos rotativos con medio DMEM que contenía suero aproximadamente al 10 por ciento (Gibco/BRL, Inc.) complementado con glutamina y aminoácidos no esenciales. Se mantuvieron las células durante de dos a tres días hasta que se alcanzó una confluencia celular de aproximadamente el 80%. En este punto se cambiaron los medios en los frascos rotativos por una mezcla de medios libre de suero (el 50 por ciento de DMEM, el 50 por ciento de F12, Gibco) complementada con glutamina y aminoácidos no esenciales. Se recogieron los medios condicionados después de siete días, añadiéndose medio libre de suero reciente durante una o dos recogidas adicionales.

5 Se purificaron los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad de proteína G directamente a partir de medio condicionado, usando procedimientos convencionales. La elución de la columna de proteína G se logró usando tampón de pH bajo (aproximadamente pH 3), después de lo cual se neutralizó la proteína de anticuerpo eluido usando Tris 1 M, pH 8,5, y luego se concentró usando concentradores centrífugos con un punto de corte de peso molecular de 10 kD. Luego se sometió la disolución madre de anticuerpo concentrado a intercambio de tampón en PBS.

Se han creado treinta y un anticuerpos, y cada uno consiste en dos cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras (kappa o lambda) tal como se designa en la siguiente tabla 2.

Tabla 2

Cadena pesada del anticuerpo	Cadena ligera del anticuerpo
526 HC*	526 kappa
528 HC*	528 lambda
531 HC*	531 lambda
533 HC*	533 lambda
535 HC*	535 lambda
536 HC*	536 kappa
537 HC*	537 lambda
540 HC*	540 lambda
543 HC*	543 kappa
544 HC*	544 kappa
545 HC*	545 lambda
546 HC*	546 lambda
551 HC*	551 kappa
553 HC*	553 kappa
555 HC*	555 kappa
558 HC	558 kappa
559 HC	559 lambda
565 HC*	565 kappa
F1-C6 HC	F1-C6 lambda
FB1-A7 HC	FB1-A7 lambda
FD-B2 HC	FD-B2 lambda
FE-B7 HC	FE-B7 kappa
FJ-G11 HC	FJ-G11 kappa
FK-E3 HC	FK-E3 kappa
G1D4 HC*	G1D4 lambda
GC1E8 HC	GC1E8 lambda
H1C12 HC	H1C12 lambda
IA1-1E7 HC	IA1-1E7 kappa
IF-1C10HC	IF-1C10 lambda
IK-2E2 HC	IK-2E2 lambda
IP-2C11 HC	IP-2C11 kappa

10 * Sometido a prueba para determinar la unión a hAng-2, mAng-2 y hAng-1 tal como se describen en el presente documento.

15 Las siguientes cuatro tablas exponen las secuencias y SEQ ID NO de las cadenas pesadas y ligeras (kappa y lambda) de los 31 anticuerpos anti-Ang-2 convertidos a partir de fago en anticuerpos de IgG1 de longitud completa. Se predijeron las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos monoclonales usando la base de datos VBASE que usa la técnica descrita por Kabat *et al.* en: Sequences of Proteins of Immunological Interest (publicación de NIH n.º 91-3242; U.S. Dept. Health and Human Services, 5ª ed.). Se alinearon regiones Fab con las secuencias en la base de datos con la secuencia de línea germinal más próxima (véase: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ALIGNMENTS.html>) y luego se compararon visualmente con tales secuencias. Las CDR para cada región variable (cadena pesada o ligera) se exponen en la tabla 7.

20 Tabla 3

Regiones variables de cadena pesada

HC de anticuerpo	Secuencia
526 HC (SEQ ID NO 1)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDLLDYDILTGPYAYWGQGTLVTVSS

ES 2 439 221 T3

528 HC (SEQ ID NO 3)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGVVGDFDWSFFDYWGQGLTVTVSS
531 HC (SEQ ID NO 5)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIILGIANYAQKFQGRVTITADKSTNTAYMELTSLS DDTAVYYCARDREDTAMVFNYWGQGLTVTVSS
533 HC (SEQ ID NO 7)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDILTGYYGYWGQGLTVTVSS
535 HC (SEQ ID NO 9)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAAFSPFTEFDAFDIWGQGMVTVSS
536 HC (SEQ ID NO 11)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDILTGYYGYWGQGLTVTVSS
537 HC (SEQ ID NO 13)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSLGLS EDTAVYYCARGSSDAAVAGMWGQGLTVTVSS
540 HC (SEQ ID NO 15)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIILGIANYAQKFQGRVTITADKFTSTAYMELSSLGS EDTAVYYCARAVPGTEDAFDIWGQGMVTVSS
543 HC (SEQ ID NO 17)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARPYDFWSPGGMVWVWGQGLTVTVSS
544 HC (SEQ ID NO 19)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARFESGYWGDAFDIWGQGMVTVSS
545 HC (SEQ ID NO 21)	QVQLQESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKGPVDFDYGDY AIDYWGQGLTVTVSS
546 HC (SEQ ID NO 23)	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKETISFSTFSGYFDYWAQGLTVTVSS
551 HC (SEQ ID NO 25)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGYDFWVSGYSLDAFDIWGQGMVTVSS
553 HC (SEQ ID NO 27)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYAMHWVRQAPG QRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSG LRSEDTAVYYCARGVDDYGGNSWAFDIWGQGMVTVSS
555 HC (SEQ ID NO 29)	QVQLQESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARSADHYDSSGYSDAFDIWGQGMVTVSS
558 HC (SEQ ID NO 31)	QVQLQQWAGLLKPSLTLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPGK GLEWIGEINHSSTNFPNPKSRITISVDTSNQVFLKSSVTAAD TAAYYCARGHDWGMGIGGAAIDYWGQGMVTVSS
559 HC (SEQ ID NO 33)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTESSMHWVRQAPG KGLEWMGGFDPEHGETIYAQKFQGRVLTMTEDTSTDTAYMELSS LRSEDTAVYFCARGVQVTSQYHYFDHWGQGLTVTVSS
565 HC (SEQ ID NO 35)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARSPIYDILTGIDAFDIWGQGMVTVSS
F1-C6 HC (SEQ ID NO 37)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDPIPSGWYFDLWGRGLTVTVSS
FB1-A7 HC (SEQ ID NO 39)	QVQLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAREVGNYYDSSGYGYWGQGLTVTVSS
FD-B2 HC (SEQ ID NO 41)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDTVSSNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRTYRKYRKYSDYAVSLRGRITINLDTSTKNQFSLQL NSVTPEDTAVYYCARDRGGYIDSWGQGLTVTVSS
FE-B7 HC (SEQ ID NO 43)	EVQLVESGGGLQPGGSLRLSCAATGFSLLDYEMNWVRQAPGR GLEWVSYIIGSGKTIFYADSVKGRFTISRDNKNSVYLMNSLR AEDTAIYYCARGGGSAYLNTSDIWGQGMVTVSS

FJ-G11 HC (SEQ ID NO 45)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDRGIAARSAYYGMDDVWGQGTITVTVSS
FK-E3 HC (SEQ ID NO 47)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDLNWVRQASG QGLEWMGWMNPTSGNTGYAQKFQGRITMTRNTSISTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDPPSGGWEFDYWGQGTITVTVSS
G1D4 HC (SEQ ID NO 49)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGGTFSSHAISWVRQAPGQ GLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCATSRLEWLLYLDYWGQGTITVTVSS
GC1E8 HC (SEQ ID NO 51)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEVRS LRSDDTAVYYCARGGSPYGGYAYPFDYWGQGTITVTVSS
H1C12 HC (SEQ ID NO 53)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDILTGYGYWGQGTITVTVSS
IAI-1E7 HC (SEQ ID NO 55)	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQSPGK GLEWIGEINHSNSTNFPNLSKRITISVDTSNQFSLKLSVTAAD TAVYYCARGHDWGMGIGGAAYDIWGQGTMTVTVSS
IF-1C10 HC (SEQ ID NO 57)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFSTYAMTWVRQAPG KGLEWVSVIRSNNGTDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCMTDYYWGQGTITVTVSS
IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKETISFSTFSGYFDYWGQGTITVTVSS
IP-2C11 HC (SEQ ID NO 61)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQATGQ GLEWMGWMNPNNGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSS LRSEDTAVYYCAKEIAVAGTRYGMDVWGQGTITVTVSS

Tabla 4

Regiones variables de cadena kappa

LC de anticuerpo	Secuencia
526 kappa (SEQ ID NO 2)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPTFGGGTKVEIK
536 kappa (SEQ ID NO 12)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGLTHWPPTFGGQTKLEIK
543 kappa (SEQ ID NO 18)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPTFGGGTKVEIK
544 kappa (SEQ ID NO 20)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGNYLDWYLQKP GQSPQILYIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGLQTPPTFGGQTKLEIK
551 kappa (SEQ ID NO 26)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPTFGGGTKVEIK
553 kappa (SEQ ID NO 28)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSATDFTLRISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPTFGGGTKVEIK
555 kappa (SEQ ID NO 30)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLASNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV YYCMQTLQIPITFGPGTKVDIK
558 kappa (SEQ ID NO 32)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSSLAWYQQKPGQAP RLLVYAASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ HYGSSPRTFGGQTKVEIK
565 kappa (SEQ ID NO 36)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSSLAWYQQKPGQAP RLLVYAASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ HYGSSPRTFGGQTKVEIK
FE-B7 kappa (SEQ ID NO 44)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSKGDNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSHRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPTFGGGTKVEIK

FJ-G11 kappa (SEQ ID NO 46)	DIVMTQTPLSLPVTPEGEPASISCRSSQSLLDSDDGKTYLDWYLQR PGQSPQLLMYTTSSRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV VYYCMQATQFPYTFGQGTKLEIK
FK-E3 kappa (SEQ ID NO 48)	DIVMTQTPLSSTVTLGQPASISCRSSQSLVHEDGNTYLNWLHQRP GQPPRLLIYKISKRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEPEDVGVY YCMQSTRFPRTFGQGTKLEIK
IA1-1E7 kappa (SEQ ID NO 56)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKAGQAP RLLIYDTSTRATGIADRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDSAVYYCQQ YDFSPLTFGGGTKVEIK
IP-2C11 kappa (SEQ ID NO 62)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSISTFLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRATGIPGRFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQHRI NWPLTFGGGTKVEIK

Tabla 5

Regiones variables de cadena lambda

LC de anticuerpo	Secuencia
528 lambda (SEQ ID NO 4)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGTYTYSWFQKPKGQSPVL VIFQDFKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSTTAVVEGTGKVTVL
531 lambda (SEQ ID NO 6)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTVSCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSLSAFWVFGGGTKLTVL
533 lambda (SEQ ID NO 8)	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPV LVIIKDSERPSPGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDADYYCQSA DSSHVVFVGGGKTLTVL
535 lambda (SEQ ID NO 10)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGNSNIGNNFVSWYQQLPGTAP KLLVYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSLSAAEVVFGGGTKLTVL
537 lambda (SEQ ID NO 14)	QSVLTQPPSVSAAPGQDVTISCSGNNSNIGNNYVSWYQQVPGTA PKLLVYDNHNRPSGISDRFSGSKSDTSATLDITGLQPGDEADYYC GTWDTLSANWVFGGGTKLTVL
540 lambda (SEQ ID NO 16)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNANYVSWYQQLPGTAP KLLIYNNKRPSGIPDRFSGSKSDTSATLGITGLQTGDEADYYCG AWDSSLSASWVFGGGTKLTVL
545 lambda (SEQ ID NO 22)	QSVLTQPSVSGAPQRVTISCTGQSSNIGAGYDVHWYQQFPGR APKLLIYGNNSRPSGVPDFRFSGSKSGTSASLAITGLQPEADYY CQSYDSRLSGSVFGGGTKLTVL
546 lambda (SEQ ID NO 24)	QSVLTQPSVSEAPRQRVTISCSGSASNIGANGVSWYHQVPGKA PRLLSHDGLVTSVDPDRSVSKSGTSASLAISGLHSDDEGDYYC AVWDDSLNAVVEFGGGTKLTVL
559 lambda (SEQ ID NO 34)	QSALTQPPSASGSPGQSTISCTGTNSDIGSYPFVSWYQRHPGKAP KLLIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDGDYYCS SFTMNSFVIFGGGKTLTVL
F1-C6 lambda (SEQ ID NO 38)	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAP KLLIYDDLLPSGVSDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA TWDDSLSGWVFGGGTKLTVL
FB1-A7 lambda (SEQ ID NO 40)	NFMLTQPHSVSESPGKVTISCTRSGGGIGSSFVHWFQQRPGSSP TTVIFDDNQRPTGVPDRFSAADTSSSSASLTISGLTAEDEADYYC QSSHSTAVVFGGGTKLTVL
FD-B2 lambda (SEQ ID NO 42)	NFMLTQPHSVSESPGKVTISCTRSSGSIATNYVQWYQQRPGSSP ATVIYEDNQRPSGVPDFRFSGIDTSSNSASLTISGLTTEDEADYFC QSYGDNNWVFGGGTKLTVL
G1D4 lambda (SEQ ID NO 50)	NFMLTQPHSVSESPGKTVIIPCTRSSGSIASNYVQWYQKRPGSAP SIVIYEDKQRPSGVPDFRFSGIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYC QSYNSRGVMFVGGGKTLTVL
GC1E8 lambda (SEQ ID NO 52)	NFMLTQPHSVLESAGKVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGTSP TNVIFEDNQRPSGVPDFRFSGIDSSNSASLTISGLKTEDEADYFC QSYDSNIWVFGGGTKLTVL

H1C12 lambda (SEQ ID NO 54)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQHLPGTAP KLLIYGNTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIAGLQAEDEADYYC QSYDSSLGSLVFGGGTKLTVL
IF-1C10 lambda (SEQ ID NO 58)	NFMLTQPHSVSESPGKVTISCTGSGGSIASNYVQWYQQRPGSA PTTVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSSTWVFGGGTKLTVL
IK-2E2 lambda (SEQ ID NO 60)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWFQQHPGK APKLMYKVNRRPSGLSNRFSGSQSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYSSSTLGFGGGKTLTVL

Tabla 6

Regiones constantes (CR) humanas

CR de anticuerpo	Secuencia
Región constante lambda humana 1 (SEQ ID NO 63)	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Región constante lambda humana 2 (SEQ ID NO 64)	GQPKAAPSRTLFPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Región constante lambda humana 3 (SEQ ID NO 65)	GQPKAAPSRTLFPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Región constante lambda humana 7 (SEQ ID NO 66)	GQPKAAPSRTLFPSSSEELQANKATLVCLVSDYFYPGAVTVAW KADGSPVKGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCRVTHEGSTVEKTVAPTECS
Región constante kappa humana (SEQ ID NO 67)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
Región constante de IgG1 humana (SEQ ID NO 68)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Tabla 7

Regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadenas pesadas (HC) y cadenas ligeras (LC) de anticuerpos frente a Ang-2

5

	CDR 1	CDR 2	CDR 3
Anticuerpo	Residuos	Residuos	Residuos
Ac 526 HC	26-36	50-66	96-113
Ac 526 KC	23-46	54-62	93-102
Ac 528 HC	26-36	50-66	96-113
Ac 528 LC	22-34	56-76	87-98
Ac 531 HC	26-36	50-66	96-110
Ac 531 LC	22-36	58-78	89-102
Ac 533 HC	26-36	50-66	96-112
Ac 533 LC	22-34	56-76	87-97
Ac 535 HC	26-36	50-66	96-111
Ac 535 LC	22-36	58-78	89-103
Ac 536 HC	26-36	50-66	96-112
Ac 536 KC	23-40	54-62	93-102
Ac 537 HC	26-36	50-66	96-109
Ac 537 LC	22-36	58-78	89-102
Ac 540 HC	26-36	50-66	96-110
Ac 540 LC	22-36	58-78	89-102
Ac 543 HC	26-36	50-66	96-113

Ac 543 KC	23-40	54-62	93-102
Ac 544 HC	26-36	50-66	96-111
Ac 544 KC	23-40	54-62	93-102
Ac 545 HC	26-36	50-66	96-113
Ac 545 LC	22-37	59-79	90-102
Ac 546 HC	26-36	50-66	96-113
Ac 546 LC	22-36	58-78	89-101
Ac 551 HC	26-36	50-66	96-114
Ac 551 KC	23-40	54-62	93-102
Ac 553 HC	26-36	50-66	96-113
Ac 553 KC	23-40	54-62	93-102
Ac 555 HC	26-36	50-66	96-118
Ac 555 KC	23-40	54-62	93-102
Ac 558 HC	26-36	50-65	95-113
Ac 558 KC	23-36	50-58	89-98
Ac 559 HC	26-36	50-66	96-112
Ac 559 LC	22-37	59-79	90-101
Ac 565 HC	26-36	50-66	96-115
Ac 565 KC	23-36	50-58	89-98
Ac F1-C6 HC	26-36	50-66	96-110
Ac F1-C6 LC	22-36	58-78	89-101
Ac FB1-A7 HC	26-36	50-66	96-112
Ac FB1-A7 LC	22-36	58-80	91-101
Ac FD-B2 HC	26-38	52-69	101-112
Ac FD-B2 LC	22-36	58-80	91-101
Ac FE-B7 HC	26-36	50-66	96-112
Ac FE-B7 KC	23-40	54-62	93-102
Ac FJ-G11 HC	26-36	50-66	96-115
Ac FJ-G11 KC	23-41	55-63	94-103
Ac FK-E3 HC	26-36	50-66	96-110
Ac FK-E3 KC	23-40	54-62	93-102
Ac G1D4 HC	26-36	50-66	96-110
Ac G1D4 LC	22-36	58-80	91-101
Ac GC1E8 HC	26-36	50-66	96-113
Ac GC1E8 LC	22-36	58-80	91-101
Ac H1C12 HC	26-36	50-66	96-112
Ac H1C12 LC	22-36	58-78	89-102
Ac IA1-1E7 HC	26-36	50-65	95-113
Ac IA1-1E7 KC	23-36	50-58	89-98
Ac IF-1C10 HC	26-37	51-66	96-102
Ac IF-1C10 LC	22-36	58-80	91-101
Ac IK-2E2 HC	26-36	50-66	96-113
Ac IK-2E2 LC	22-37	59-79	90-101
Ac IP-2C11 HC	26-36	50-66	96-112
Ac IP-2C11 KC	23-35	49-57	88-97

Se sometieron a prueba diecisiete de los anticuerpos y una IgG1 de control negativo (denominada RDB1) usando ELISA de afinidad y neutralización (tal como se describió en el ejemplo 3 anterior) así como el ensayo de neutralización BIAcore para determinar sus capacidades de afinidad, neutralización y especificidad. Los resultados se exponen a continuación (tabla 8) y se calcularon usando procedimientos convencionales.

5

Tabla 8

CE50 y CI50 de anticuerpos frente a Ang-2

Anticuerpo	hAng-2		mAng-2		hAng-1	
	CI50 (nM)	CE50 (nM)	CI50 (nM)	CE50 (nM)	CI50 (nM)	CE50 (nM)
Ac 536	0,08	0,005	0,05	0,01	114,65	30
Ac 565	0,26		0,26		Sin inhibición	
Ac 546	0,37		1,09		Sin inhibición	
Ac 543	0,51		0,24		Sin inhibición	
Ac 533	0,3		0,08		Sin inhibición	
Ac 537	0,56		0,62		Sin inhibición	
Ac 540	0,70		1,53		Sin inhibición	

Ac 544	0,97		1,82		23,32	
Ac 545	1,04	0,02	1,30	0,05	8,31	2
Ac 528	1,37		0,73		Sin inhibición	
Ac G1D4	1,39		0,60		69,48	
Ac 551	1,41		2,88		Sin inhibición	
Ac 553	1,47		1,41		Sin inhibición	
Ac 526	1,83		0,27		243,15	
Ac 531	2,15		1,67		Sin inhibición	
Ac 555	2,21		1,76		Sin inhibición	
Ac 535	2,81		2,45		Sin inhibición	
RDB1	Sin inhibición	Sin unión	Sin inhibición	Sin unión	Sin inhibición	Sin unión

Se evaluaron dos anticuerpos, el clon 536 y el clon 545, usando el análisis BIAcore descrito anteriormente. Se determinó la unión de anticuerpo tal como se describió anteriormente para el ensayo BIAcore, indicando K_D inferiores mayores afinidades, y los resultados se notifican la siguiente tabla 9.

Tabla 9

5 Afinidades del anticuerpos por hAng-2 y mAng-2

Ac	hAng-2			mAng-2		
	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
Ac 536	0,12	$3,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^{-5}$	0,15	$6,2 \times 10^5$	$9,5 \times 10^{-5}$
Ac 545	1,2	$3,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^{-4}$	0,9	$5,9 \times 10^5$	$5,3 \times 10^{-4}$

Ejemplo 5

Estudios de eficacia terapéutica usando anticuerpos anti-Ang-2

10 Se examinó en ratones la farmacocinética de anticuerpos policlonales de conejo anti-Ang 2 purificados mediante proteína G. Se trataron veinticuatro ratones con anticuerpo policlonal de conejo anti-Ang-2 (1 mg por ratón). Se sacrificaron cuatro animales tratados en cada uno de los siguientes puntos de tiempo tras la inyección de anticuerpo: 1 hora, 6 horas, 1 día, 3 días, 7 días y 14 días.

Los resultados indicaron que la IgG de conejo total tenía una semivida circulatoria en suero de aproximadamente 19 días, mientras que el componente de IgG anti-Ang-2 de la IgG total tenía una vida media de aproximadamente ocho días.

15 Para evaluar la eficacia terapéutica, a ratones (10 animales/grupo) que portaban xenoinjertos de tumor A431, se les administraron 10 dosis (aproximadamente 10 mg de IgG por ratón por dosis) por vía intraperitoneal de anticuerpo policlonal anti-mAng-2 purificado mediante proteína G los días 1, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15 y 18 tras el xenoinjerto. Se midió el tamaño del tumor los días 7, 12, 15, 19 y 21. Se midió el peso corporal los días 0, 7, 15 y 21, y no se vio afectado por el tratamiento. Los resultados indicaron que el anticuerpo policlonal anti-Ang-2 inhibía el crecimiento del
20 xenoinjerto de tumor A431 en aproximadamente el 50 por ciento con $p=0,008$ frente a controles de antisuero policlonal purificado no inmunitario (10 mg de IgG por ratón por dosis) y vehículo (PBS) mediante ANOVA de medidas repetidas.

25 Para someter a prueba la eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-Ang-2 completamente humanos *in vivo*, se trataron ratones (10 animales/grupo) que portaban xenoinjertos de tumor A431 por vía intraperitoneal o bien con el clon de anticuerpo anti-Ang-2 533, 537 ó 544, o bien con controles negativos de PBS o IgG1-kappa humana. La dosificación fue de aproximadamente 420 ug de proteína por ratón para la primera dosis, aproximadamente 140 ug de proteína por ratón para cada una de las siguientes tres dosis, y aproximadamente 55 ug de proteína por ratón para cada una de las siguientes cuatro dosis, para un total de 8 dosis por ratón. Se registraron los volúmenes de tumor y los pesos corporales dos veces por semana. Al final del estudio, se sacrificaron los animales y se recogió su
30 suero para medir los niveles de anticuerpo mediante ELISA. Se recogieron tumores y un panel de tejidos normales de todos los grupos.

35 Se encontraron diferencias notables en el crecimiento tumoral entre los grupos tratados con anticuerpo anti-Ang-2 y los grupos control tal como se muestra en la figura 1. Los tres tratamientos con anticuerpo anti-Ang-2 inhibieron el crecimiento tumoral en comparación con los controles ($p < 0,005$ frente a control de hlgG1 en todos los tratamientos usando ANOVA de medidas repetidas para los 3 anticuerpos). Por el contrario, los tumores en los grupos control continuaron creciendo a una velocidad mucho mayor.

Ejemplo 6

Mapeo de epítipo

Se clonaron proteínas de Ang-2 humana (hAng-2) de longitud completa (aminoácidos 1-495), N-terminal

(aminoácidos 1-254) y C-terminal (aminoácidos 255-495) en un vector de expresión de mamífero dirigido por CMV con 6x etiquetas de His C-terminales. Se expresaron de manera transitoria los tres constructos resultantes más un control de vector en células 293T. Luego se recogieron medios condicionados a partir de las células transfectadas y se estimó el nivel de expresión de Ang-2 en los medios mediante inmunotransferencia de tipo Western y ELISA anti-6xhis.

Se determinó el epítipo unión de pepticuerpos y anticuerpos anti-Ang-2 mediante su capacidad para unirse a las tres versiones de hAng-2 humana mediante ELISA según el siguiente protocolo: se recubrió una placa de ensayo de 96 pocillos de alta capacidad de unión con 100 µl de medios condicionados por pocillo, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se aspiraron los medios condicionados y se bloqueó la placa con 200 µl por pocillo de BSA al 5% en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se aspiró la disolución de bloqueo. Se añadieron 100 µl por pocillo de anticuerpo, pepticuerpo o Tie2-Fc a 1 µg/ml en BSA al 1% en PBS, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron los pocillos 4 veces con 200 µl de Tween al 0,1% en PBS. Se añadieron 100 µl por pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón o anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP, y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Luego se lavaron los pocillos 4 veces con 200 µl de Tween al 0,1% en PBS. Luego se añadieron 100 µl por pocillo de sustrato de TMB. Se realizó una lectura de D.O. a 370 nm.

Los resultados se exponen en la figura 2A, la figura 2B y la figura 2C.

Los aspectos de la invención son:

1. Un agente de unión específico que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO. 3; SEQ ID NO. 5; SEQ ID NO. 7; SEQ ID NO. 9; SEQ ID NO. 11; SEQ ID NO. 13; SEQ ID NO. 15; SEQ ID NO. 17; SEQ ID NO. 19; SEQ ID NO. 21; SEQ ID NO. 23; SEQ ID NO. 25; SEQ ID NO. 27; SEQ ID NO. 29; SEQ ID NO. 31; SEQ ID NO. 33; SEQ ID NO. 35; SEQ ID NO. 37; SEQ ID NO. 39; SEQ ID NO. 41; SEQ ID NO. 43; SEQ ID NO. 45; SEQ ID NO. 47; SEQ ID NO. 49; SEQ ID NO. 51; SEQ ID NO. 53; SEQ ID NO. 55; SEQ ID NO. 57; SEQ ID NO. 59; SEQ ID NO. 61; SEQ ID NO. 2; SEQ ID NO. 12; SEQ ID NO. 18; SEQ ID NO. 20; SEQ ID NO. 26; SEQ ID NO. 28; SEQ ID NO. 30; SEQ ID NO. 32; SEQ ID NO. 36; SEQ ID NO. 44; SEQ ID NO. 46; SEQ ID NO. 48; SEQ ID NO. 56; SEQ ID NO. 62; SEQ ID NO. 4; SEQ ID NO. 6; SEQ ID NO. 8; SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 14; SEQ ID NO. 16; SEQ ID NO. 22; SEQ ID NO. 24; SEQ ID NO. 34; SEQ ID NO. 38; SEQ ID NO. 40; SEQ ID NO. 42; SEQ ID NO. 50; SEQ ID NO. 52; SEQ ID NO. 54; SEQ ID NO. 58 y SEQ ID NO. 60;

y fragmentos de los mismos.

2. El agente de unión específico según el punto 1 que es un anticuerpo.

3. El anticuerpo del punto 2 que es un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado o completamente humano.

4. El anticuerpo del punto 3 que es un anticuerpo de cadena individual.

5. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal según el punto 3.

6. Un conjugado que comprende un agente de unión específico del punto 1.

7. Un conjugado que comprende un anticuerpo del punto 2, 3 ó 4.

8. Una molécula de ácido nucleico que codifica para el agente de unión específico anticuerpo del punto 1.

9. Una molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo del punto 2, 3 ó 4.

10. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico del punto 8 ó 9.

11. Una célula huésped que contiene el vector según el punto 10.

12. Un método de preparación de un agente de unión específico que comprende:

(a) transformar una célula huésped con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para el agente de unión específico del punto 1;

(b) expresar la molécula de ácido nucleico en dicha célula huésped; y

(c) aislar dicho agente de unión específico.

13. Un método de preparación de un anticuerpo que comprende:

(a) transformar una célula huésped con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo del punto 2, 3 ó 4;

- (b) expresar la molécula de ácido nucleico en dicha célula huésped; y
- (c) aislar dicho agente de unión específico.
14. Un método de inhibición de la angiogénesis no deseada en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión específico según el punto 1.
- 5 15. Un método de tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión específico según el punto 1.
16. Un método de inhibición de la angiogénesis no deseada en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según el punto 2, 3 ó 4.
- 10 17. Un método de tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según el punto 2, 3 ó 4.
18. Una composición farmacéutica que comprende el agente de unión específico del punto 1 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.
19. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo del punto 2, 3 ó 4 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.
- 15 20. Un método de modulación o inhibición de la actividad de angiopoyetina-2 que comprende administrar el agente de unión específico del punto 1.
21. Un método de modulación o inhibición de la actividad de angiopoyetina-2 que comprende administrar el anticuerpo del punto 2, 3 ó 4.
- 20 22. Un método de modulación de al menos una de permeabilidad vascular o extravasación plasmática en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión específico según el punto 1.
23. Un método de tratamiento de al menos una de enfermedad neovascular ocular, obesidad, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, trastornos inflamatorios, aterosclerosis, endometriosis, enfermedad neoplásica, enfermedad relacionada con los huesos o psoriasis en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión específico según el punto 1.
- 25 24. Un método de modulación de al menos una de permeabilidad vascular o extravasación plasmática en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo según el punto 2, 3 ó 4.
- 30 25. Un método de tratamiento de al menos una de enfermedad neovascular ocular, obesidad, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, trastornos inflamatorios, aterosclerosis, endometriosis, enfermedad neoplásica, enfermedad relacionada con los huesos o psoriasis en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo según el punto 2, 3 ó 4.
26. Un método de tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión específico según el punto 1 y un agente quimioterápico.
- 35 27. El método según el punto 26, en el que el agente de unión específico y el agente quimioterápico no se administran simultáneamente.
28. Un método de tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según el punto 2, 3 ó 4 y un agente quimioterápico.
29. El método según el punto 26, en el que el agente de unión específico y el agente quimioterápico no se administran simultáneamente
- 40 30. Un agente de unión específico que comprende CDR 1 de cualquiera de:
- 526 HC (SEQ ID NO. 1); 528 HC (SEQ ID NO. 3); 531 HC (SEQ ID NO. 5); 533 HC (SEQ ID NO. 7); 535 HC (SEQ ID NO. 9); 536 HC (SEQ ID NO. 11); 537 HC (SEQ ID NO. 13); 540 HC (SEQ ID NO. 15); 543 HC (SEQ ID NO. 17); 544 HC (SEQ ID NO. 19); 545 HC (SEQ ID NO. 21); 546 HC (SEQ ID NO. 23); 551 HC (SEQ ID NO. 25); 553 HC (SEQ ID NO. 27); 555 HC (SEQ ID NO. 29); 558 HC (SEQ ID NO. 31); 559 HC (SEQ ID NO. 33); 565 HC (SEQ ID NO. 35); F1-C6 HC (SEQ ID NO. 37); FB1-A7 HC (SEQ ID NO. 39); FD-B2 HC (SEQ ID NO. 41); FE-B7 HC (SEQ ID NO. 43); FJ-G11 HC (SEQ ID NO. 45); FK-E3 HC (SEQ ID NO. 47); G1D4 HC (SEQ ID NO. 49); GC1E8 HC (SEQ ID NO. 51); H1C12 HC (SEQ ID NO. 53); IA1-IE7 HC (SEQ ID NO. 55); IF-1C10 HC (SEQ ID NO. 57); IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59); IP-2C11 HC (SEQ ID NO. 61); 526 kappa (SEQ ID NO. 2); 536 kappa (SEQ ID NO. 12); 543 kappa (SEQ ID NO. 18); 544 kappa (SEQ ID NO. 20); 551 kappa (SEQ ID NO. 26); 553 kappa (SEQ ID NO. 28); 555 kappa (SEQ ID NO. 30); 558 kappa (SEQ ID NO. 32); 565 kappa (SEQ ID NO. 36); FE-B7 kappa (SEQ ID NO. 44); FJ-G11

5 kappa (SEQ ID NO. 46); FK-E3 kappa (SEQ ID NO. 48); IA1-IE7 kappa (SEQ ID NO. 56); IP- 2C11 kappa (SEQ ID NO. 62); 528 lambda (SEQ ID NO. 4); 531 lambda (SEQ ID NO. 6); 533 lambda (SEQ ID NO. 8); 535 lambda (SEQ ID NO. 10); 537 lambda (SEQ ID NO. 14); 540 lambda (SEQ ID NO. 16); 545 lambda (SEQ ID NO. 22); 546 lambda (SEQ ID NO. 24); 559 lambda (SEQ ID NO. 34); F1-C6 lambda (SEQ ID NO. 38); FB1-A7 lambda (SEQ ID NO. 40); FD-B2 lambda (SEQ ID NO. 42); G1D4 lambda (SEQ ID NO. 50); GC1E8 lambda (SEQ ID NO. 52); H1C12 lambda (SEQ ID NO. 54); IF-1C10 lambda (SEQ ID NO. 58); e IK-2E2 lambda (SEQ ID NO. 60)

31. Un agente de unión específico que comprende CDR 2 de cualquiera de:

10 526 HC (SEQ ID NO. 1); 528 HC (SEQ ID NO. 3); 531 HC (SEQ ID NO. 5); 533 HC (SEQ ID NO. 7); 535 HC (SEQ ID NO. 9); 536 HC (SEQ ID NO. 11); 537 HC (SEQ ID NO. 13); 540 HC (SEQ ID NO. 15); 543 HC (SEQ ID NO. 17); 544 HC (SEQ ID NO. 19); 545 HC (SEQ ID NO. 21); 546 HC (SEQ ID NO. 23); 551 HC (SEQ ID NO. 25); 553 HC (SEQ ID NO. 27); 555 HC (SEQ ID NO. 29); 558 HC (SEQ ID NO. 31); 559 HC (SEQ ID NO. 33); 565 HC (SEQ ID NO. 35); F1-C6 HC (SEQ ID NO. 37); FB1-A7 HC (SEQ ID NO. 39); FD-B2 HC (SEQ ID NO. 41); FE-B7 HC (SEQ ID NO. 43); FJ-G11 HC (SEQ ID NO. 45); FK-E3 HC (SEQ ID NO. 47); G1D4 HC (SEQ ID NO. 49); GC1E8 HC (SEQ ID NO. 51); H1C12 HC (SEQ ID NO. 53); IA1-IE7 HC (SEQ ID NO. 55); IF-1C10 HC (SEQ ID NO. 57); IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59); IP-2C11 HC (SEQ ID NO. 61); 526 kappa (SEQ ID NO. 2); 536 kappa (SEQ ID NO. 12); 543 kappa (SEQ ID NO. 18); 544 kappa (SEQ ID NO. 20); 551 kappa (SEQ ID NO. 26); 553 kappa (SEQ ID NO. 28); 555 kappa (SEQ ID NO. 30); 558 kappa (SEQ ID NO. 32); 565 kappa (SEQ ID NO. 36); FE-B7 kappa (SEQ ID NO. 44); FJ-G11 kappa (SEQ ID NO. 46); FK-E3 kappa (SEQ ID NO. 48); IA1-IE7 kappa (SEQ ID NO. 56); IP- 2C11 kappa (SEQ ID NO. 62); 528 lambda (SEQ ID NO. 4); 531 lambda (SEQ ID NO. 6); 533 lambda (SEQ ID NO. 8); 535 lambda (SEQ ID NO. 10); 537 lambda (SEQ ID NO. 14); 540 lambda (SEQ ID NO. 16); 545 lambda (SEQ ID NO. 22); 546 lambda (SEQ ID NO. 24); 559 lambda (SEQ ID NO. 34); F1-C6 lambda (SEQ ID NO. 38); FB1-A7 lambda (SEQ ID NO. 40); FD-B2 lambda (SEQ ID NO. 42); G1D4 lambda (SEQ ID NO. 50); GC1E8 lambda (SEQ ID NO. 52); H1C12 lambda (SEQ ID NO. 54); IF-1C10 lambda (SEQ ID NO. 58); e IK-2E2 lambda (SEQ ID NO. 60)

32. Un agente de unión específico que comprende CDR 3 de cualquiera de:

25 526 HC (SEQ ID NO. 1); 528 HC (SEQ ID NO. 3); 531 HC (SEQ ID NO. 5); 533 HC (SEQ ID NO. 7); 535 HC (SEQ ID NO. 9); 536 HC (SEQ ID NO. 11); 537 HC (SEQ ID NO. 13); 540 HC (SEQ ID NO. 15); 543 HC (SEQ ID NO. 17); 544 HC (SEQ ID NO. 19); 545 HC (SEQ ID NO. 21); 546 HC (SEQ ID NO. 23); 551 HC (SEQ ID NO. 25); 553 HC (SEQ ID NO. 27); 555 HC (SEQ ID NO. 29); 558 HC (SEQ ID NO. 31); 559 HC (SEQ ID NO. 33); 565 HC (SEQ ID NO. 35); F1-C6 HC (SEQ ID NO. 37); FB1-A7 HC (SEQ ID NO. 39); FD-B2 HC (SEQ ID NO. 41); FE-B7 HC (SEQ ID NO. 43); FJ-G11 HC (SEQ ID NO. 45); FK-E3 HC (SEQ ID NO. 47); G1D4 HC (SEQ ID NO. 49); GC1E8 HC (SEQ ID NO. 51); H1C12 HC (SEQ ID NO. 53); IA1-IE7 HC (SEQ ID NO. 55); IF-1C10 HC (SEQ ID NO. 57); IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59); IP-2C11 HC (SEQ ID NO. 61); 526 kappa (SEQ ID NO. 2); 536 kappa (SEQ ID NO. 12); 543 kappa (SEQ ID NO. 18); 544 kappa (SEQ ID NO. 20); 551 kappa (SEQ ID NO. 26); 553 kappa (SEQ ID NO. 28); 555 kappa (SEQ ID NO. 30); 558 kappa (SEQ ID NO. 32); 565 kappa (SEQ ID NO. 36); FE-B7 kappa (SEQ ID NO. 44); FJ-G11 kappa (SEQ ID NO. 46); FK-E3 kappa (SEQ ID NO. 48); IA1-IE7 kappa (SEQ ID NO. 56); IP- 2C11 kappa (SEQ ID NO. 62); 528 lambda (SEQ ID NO. 4); 531 lambda (SEQ ID NO. 6); 533 lambda (SEQ ID NO. 8); 535 lambda (SEQ ID NO. 10); 537 lambda (SEQ ID NO. 14); 540 lambda (SEQ ID NO. 16); 545 lambda (SEQ ID NO. 22); 546 lambda (SEQ ID NO. 24); 559 lambda (SEQ ID NO. 34); F1-C6 lambda (SEQ ID NO. 38); FB1-A7 lambda (SEQ ID NO. 40); FD-B2 lambda (SEQ ID NO. 42); G1D4 lambda (SEQ ID NO. 50); GC1E8 lambda (SEQ ID NO. 52); H1C12 lambda (SEQ ID NO. 54); IF-1C10 lambda (SEQ ID NO. 58); e IK-2E2 lambda (SEQ ID NO. 60)

33. Una molécula de ácido nucleico que codifica para el agente de unión específico según cualquiera de los puntos 30, 31 ó 32.

34. Un método de detección del nivel de angiopoyetina-2 en una muestra biológica que comprende

- 45 (a) poner en contacto un agente de unión específico del punto 1 con la muestra; y
(b) determinar el grado de unión del agente de unión específico a dicha muestra.

35. Un método de detección del nivel de angiopoyetina-2 en una muestra biológica que comprende

- (a) poner en contacto un anticuerpo del punto 20 con dicha muestra; y
(b) determinar el grado de unión del anticuerpo a dicha muestra.

50 36. Un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo dicha cadena pesada una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en:

526 HC (SEQ ID NO. 1); 528 HC (SEQ ID NO. 3); 531 HC (SEQ ID NO. 5); 533 HC (SEQ ID NO. 7); 535 HC (SEQ ID NO. 9); 536 HC (SEQ ID NO. 11); 537 HC (SEQ ID NO. 13); 540 HC (SEQ ID NO. 15); 543 HC (SEQ ID NO. 17); 544 HC (SEQ ID NO. 19); 545 HC (SEQ ID NO. 21); 546 HC (SEQ ID NO. 23); 551 HC (SEQ ID NO. 25); 553 HC (SEQ ID NO. 27); 555 HC (SEQ ID NO. 29); 558 HC (SEQ ID NO. 31); 559 HC (SEQ ID NO. 33); 565 HC (SEQ ID NO. 35); F1-C6 HC (SEQ ID NO. 37); FB1-A7 HC (SEQ ID NO. 39); FD-B2 HC (SEQ ID NO. 41); FE-B7 HC (SEQ ID NO. 43); FJ-G11 HC (SEQ ID NO. 45); FK-E3 HC (SEQ ID NO. 47); G1D4 HC (SEQ ID NO. 49); GC1E8 HC (SEQ ID NO. 51); H1C12 HC (SEQ ID NO. 53); IA1-IE7 HC (SEQ ID NO. 55); IF-1C10 HC (SEQ ID NO. 57); IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59); IP-2C11 HC (SEQ ID NO. 61); 526 kappa (SEQ ID NO. 2); 536 kappa (SEQ ID NO. 12); 543 kappa (SEQ ID NO. 18); 544 kappa (SEQ ID NO. 20); 551 kappa (SEQ ID NO. 26); 553 kappa (SEQ ID NO. 28); 555 kappa (SEQ ID NO. 30); 558 kappa (SEQ ID NO. 32); 565 kappa (SEQ ID NO. 36); FE-B7 kappa (SEQ ID NO. 44); FJ-G11 kappa (SEQ ID NO. 46); FK-E3 kappa (SEQ ID NO. 48); IA1-IE7 kappa (SEQ ID NO. 56); IP- 2C11 kappa (SEQ ID NO. 62); 528 lambda (SEQ ID NO. 4); 531 lambda (SEQ ID NO. 6); 533 lambda (SEQ ID NO. 8); 535 lambda (SEQ ID NO. 10); 537 lambda (SEQ ID NO. 14); 540 lambda (SEQ ID NO. 16); 545 lambda (SEQ ID NO. 22); 546 lambda (SEQ ID NO. 24); 559 lambda (SEQ ID NO. 34); F1-C6 lambda (SEQ ID NO. 38); FB1-A7 lambda (SEQ ID NO. 40); FD-B2 lambda (SEQ ID NO. 42); G1D4 lambda (SEQ ID NO. 50); GC1E8 lambda (SEQ ID NO. 52); H1C12 lambda (SEQ ID NO. 54); IF-1C10 lambda (SEQ ID NO. 58); e IK-2E2 lambda (SEQ ID NO. 60)

ES 2 439 221 T3

NO. 43); FJ-G11 HC (SEQ ID NO. 45); FK-E3 HC (SEQ ID NO. 47); G1D4 HC (SEQ ID NO. 49); GC1E8 HC (SEQ ID NO. 51); H1C12 HC (SEQ ID NO. 53); IA1-IE7 HC (SEQ ID NO. 55); IF-1C10 HC (SEQ ID NO. 57); IK-2E2 HC (SEQ ID NO. 59); IP-2C11 HC (SEQ ID NO. 61);

y fragmentos de unión a antígeno de los mismos;

5 y comprendiendo dicha cadena ligera una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en:

526 kappa (SEQ ID NO. 2); 536 kappa (SEQ ID NO. 12); 543 kappa (SEQ ID NO. 18); 544 kappa (SEQ ID NO. 20); 551 kappa (SEQ ID NO. 26); 553 kappa (SEQ ID NO. 28); 555 kappa (SEQ ID NO. 30); 558 kappa (SEQ ID NO. 32); 565 kappa (SEQ ID NO. 36); FE-B7 kappa (SEQ ID NO. 44); FJ-G11 kappa (SEQ ID NO. 46); FK-E3 kappa (SEQ ID NO. 48); IA1-IE7 kappa (SEQ ID NO. 56); IP- 2C11 kappa (SEQ ID NO. 62); 528 lambda (SEQ ID NO. 4); 531 lambda (SEQ ID NO. 6); 533 lambda (SEQ ID NO. 8); 535 lambda (SEQ ID NO. 10); 537 lambda (SEQ ID NO. 14); 540 lambda (SEQ ID NO. 16); 545 lambda (SEQ ID NO. 22); 546 lambda (SEQ ID NO. 24); 559 lambda (SEQ ID NO. 34); F1-C6 lambda (SEQ ID NO. 38); FB1-A7 lambda (SEQ ID NO. 40); FD-B2 lambda (SEQ ID NO. 42); G1D4 lambda (SEQ ID NO. 50); GC1E8 lambda (SEQ ID NO. 52); H1C12 lambda (SEQ ID NO. 54); IF-1C10 lambda (SEQ ID NO. 58); IK-2E2 lambda (SEQ ID NO. 60)

10
15 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos;

37. Una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo según el punto 36.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> AMGEN INC.
 <120> AGENTES DE UNIÓN ESPECÍFICOS DE ANGIOPOYETINA-2
 <130> EP68093IHV210pau
 5 <140> AÚN NO CONCEDIDA
 <141> adjunto
 <150> documento 02 780 442.6
 <151> 11/10/2002
 <150> documento PCT/US02/32613
 10 <151> 11/10/2002
 <150> documento US 10/269.805
 <151> 10/10/2002
 <160> 76
 <170> PatentIn versión 3.1
 15 <210> 1
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1
 Glu val Gln Leu val Glu ser Gly Gly Gly val val Gln Pro Gly Arg
 1 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 Gly Met His Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp val
 35 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala val Tyr Tyr Cys
 80 Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Pro Tyr Ala Tyr
 100 Trp Gly Gln Gly Thr Leu val Thr val Ser ser
 115 120
 20 <210> 2
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 2

ES 2 439 221 T3

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

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

<210> 4

10 <211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

15 <210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

```

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

<210> 6

5 <211> 111

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

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

10

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 7

```

Glu val Gln Leu val Gln 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 Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala 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
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu val Thr val Ser Ser
115 120
    
```

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 8

```

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

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

```

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

<210> 10

<211> 112

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

<210> 11

<211> 122

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Gln 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 Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala 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 Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12

<211> 112

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

<210> 13

15 <211> 119

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

```

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

<210> 14

5 <211> 111

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

```

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

10 <210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

```

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

15

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

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

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 17

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

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

<210> 19

<211> 121

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 19

```

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

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

```

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

<210> 21

15 <211> 123

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

ES 2 439 221 T3

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

<210> 22

<211> 111

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

<210> 23

<211> 123

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

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

15 <210> 24

<211> 110

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

```

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

<210> 25

<211> 124

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

```

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

<210> 26

10 <211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

```

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

15 <210> 27

<211> 123

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Gly Val Asp Asp Tyr Gly Gly Asn Ser Trp Ala Phe Asp Ile
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val ser ser
115 120
    
```

<210> 28

5 <211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
    
```

10 <210> 29

<211> 128

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Ser Ala Ser Asp His Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser
Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
    
```

15

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

<210> 31

<211> 123

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

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

<210> 32

<211> 108

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Val Tyr Ala Ala Ser Ser Arg 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 His Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 33

<211> 122

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 33

```

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 val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Ser
20 25 30
Ser Met His Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu His Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Leu Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly val Gln val Thr Ser Gly Tyr His Tyr Phe Asp His Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu val Thr val Ser Ser
115 120
    
```

<210> 34

<211> 110

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

```

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

<210> 35

<211> 125

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala Arg Ser Pro Ile Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Ile Asp Ala Phe
 Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 Val Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Pro
 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 37

<211> 120

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala Arg Asp Pro Ile Pro Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 38

<211> 110

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

```

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

5 <210> 39

<211> 122

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

```

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

10

<210> 40

<211> 110

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 40

```

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

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 41

```

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

<210> 42

<211> 110

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

```

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

<210> 43

<211> 122

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Glu val Gln Leu val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gln Pro Gly Gly
 1 Ser Leu Arg Leu 5 Ser Cys Ala Ala Thr 10 Gly Phe Ser Leu Asp Asp Tyr
 20 Glu Met Asn Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp val
 35 Ser Tyr Ile Ile Gly Ser Gly Lys Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser val
 50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Ser val Tyr
 65 Leu Gln Met Asn Ser 70 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 Ala Arg Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Leu Asn Thr Ser Asp Ile Trp
 100 Gly Gln Gly Thr Met val Thr val Ser Ser
 115 120

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

Asp Ile val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro val Thr Pro Gly
 1 Glu Pro Ala Ser 5 Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 Lys Gly Asp Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser His Arg Ala Ser Gly val Pro
 50 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 Ser Arg val Glu Ala Glu Asp val Gly val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 Leu Gln Thr Pro 100 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys val Glu Ile Lys
 105 110

<210> 45

<211> 125

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Gln val Gln Leu val Gln Ser Gly Ala Glu val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 Ser val Lys val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 Gly Ile Ser Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 Gln Gly Arg val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 Met Glu Leu Arg Ser 70 Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala val Tyr Tyr Cys
 85 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 Asp val Trp Gly Gln Gly Thr Thr val Thr val ser Ser
 115 120 125

<210> 46

15 <211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

```

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

<210> 47

5 <211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

```

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

10

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 48

```

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

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

```

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

```

5

<210> 50

<211> 110

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 50

```

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

```

<210> 51

<211> 123

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 51

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

<210> 52

<211> 110

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

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

<210> 53

<211> 122

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

Glu 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 Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala 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 Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54

15 <211> 111

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 54

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

<210> 55

5 <211> 123

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

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

10 <210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 56

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Thr Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Ala 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
 Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Phe Ser Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 57

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Ser Thr
 Tyr Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 Val Ser Val Ile Arg Ser Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Asp Phe Val
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Met Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 58

<211> 110

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 58

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ala Ser Asn
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
 Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
 Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 59

<211> 123

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala Lys Glu Thr Ile Ser Phe Ser Thr Phe Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110 115 120

<210> 60

<211> 110

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

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

<210> 61

<211> 122

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 61

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

<210> 62

<211> 107

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 62

ES 2 439 221 T3

1 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 5 Leu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Phe
 20 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly
 50 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Arg Ile Asn Trp Pro Leu
 85 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 63

<211> 106

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

1 Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 5 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
 35 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 64

<211> 106

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

1 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 5 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

15 <210> 65

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

ES 2 439 221 T3

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

<210> 66

<211> 106

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

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

<210> 67

<211> 107

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

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

<210> 68

15 <211> 330

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 68

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 330

<210> 69

5 <211> 22

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 69

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys
 20

10 <210> 70

<211> 40

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 70

15 gtggttgaga ggtgccagat gtcagggtcca gctgggtgcag

40

<210> 71

	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 71	
5	attacgtctc acagttcgtt tgatctccac	30
	<210> 72	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 72	
	ccgctcagct cctggggctc ctgctattgt ggttgagaag tgccagat	48
	<210> 73	
	<211> 9	
	<212> PRT	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 73	
	Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu	
	1 5	
	<210> 74	
	<211> 54	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 74	
	cagcagaagc ttctagacca ccatggacat gagggtcccc gctcagctcc tggg	54
	<210> 75	
25	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 75	
	gtggttgaga ggtgccagat gtgacattgt gatgactcag tctcc	45
30	<210> 76	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 76	
35	cttgctcgact tattaacact ctcccctggt g	31

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que:
 - 5 (a) dicha región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 que tiene no más de cinco sustituciones de aminoácidos y dicha región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 que tiene no más de dos sustituciones de aminoácidos;
 - 10 (b) dicha región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 que tiene no más de cinco sustituciones de aminoácidos y dicha región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 que tiene no más de dos sustituciones de aminoácidos; o
 - 15 (c) dicha región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 que tiene no más de cinco sustituciones de aminoácidos y dicha región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 que tiene no más de dos sustituciones de aminoácidos;

y en el que el anticuerpo se une a e inhibe angiopoyetina-2 (Ang-2).
2. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo aislado según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo es completamente humano.
- 20 4. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado según la reivindicación 3 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.
5. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
6. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5.
7. Una célula huésped aislada que contiene el vector según la reivindicación 6.
- 25 8. Un conjugado que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
9. Un método de preparación de un anticuerpo que comprende:
 - (a) transformar una célula huésped con al menos una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5;
 - (b) expresar la molécula de ácido nucleico en la célula huésped; y
 - (c) aislar el anticuerpo,

30 en el que la célula huésped no es una célula humana.
10. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en la inhibición de la angiogénesis no deseada.
11. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 35 12. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en la inhibición de la actividad de angiopoyetina-2.
13. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en el tratamiento de al menos una de enfermedad neovascular ocular, hemangioblastoma, hemangioma, enfermedad inflamatoria, trastornos inflamatorios crónicos, endometriosis, enfermedad neoplásica, enfermedad relacionada con los huesos o psoriasis.
- 40 14. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un agente quimioterápico para su uso en el tratamiento de cáncer.

FIG. 1

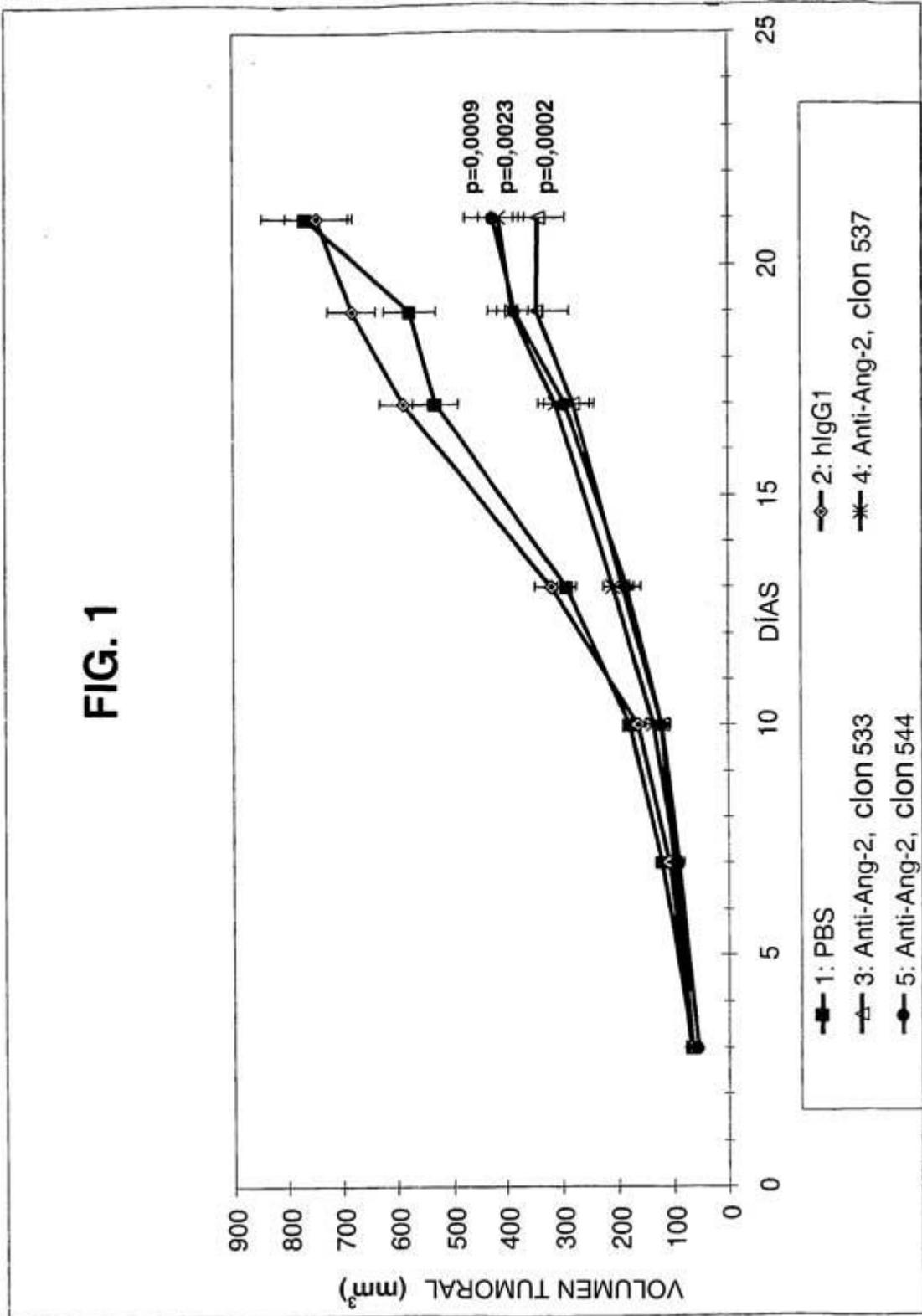


Figura 2a
Mapeo de epítomos

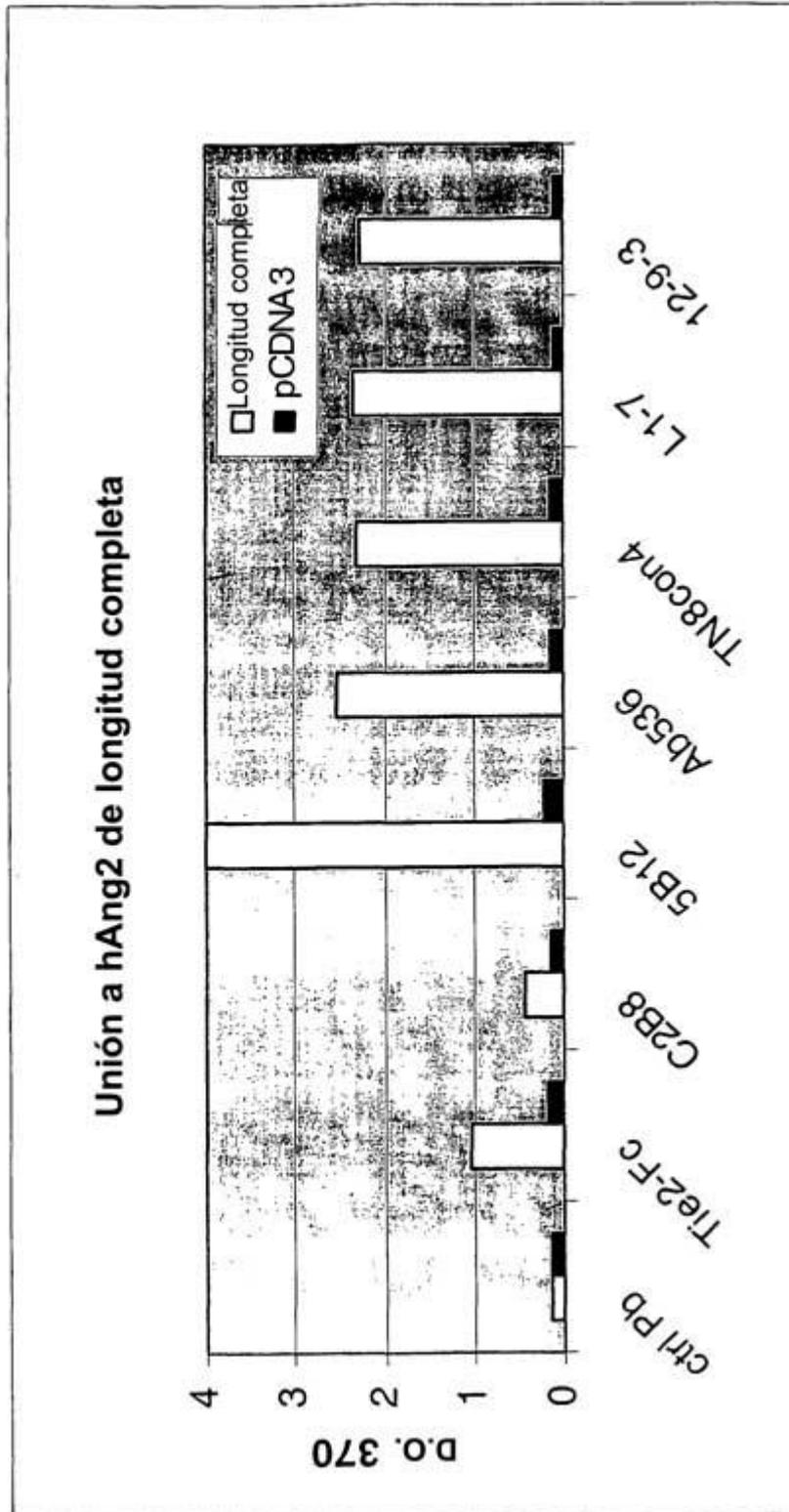


Figura 2b
Mapeo de epítomos

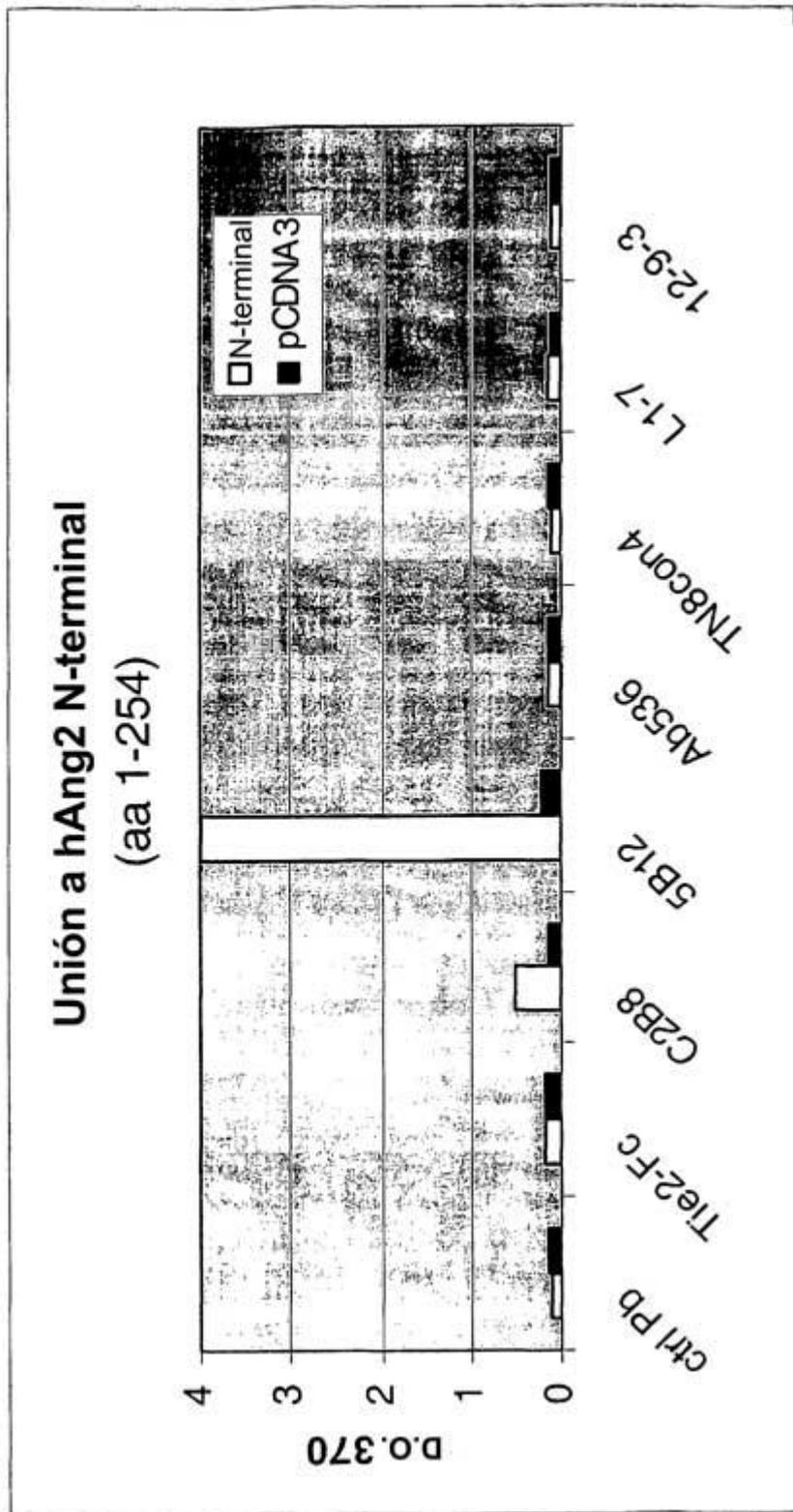


Figura 2c
Mapeo de epítomos

