

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 217**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2009 E 09736830 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 2344537**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-ANG-2**

30 Prioridad:

08.10.2008 EP 08017607
16.12.2008 EP 08021834

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2014

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

BAEHNER, MONIKA;
BRINKMANN, ULRICH;
GEORGES, GUY;
GRIEP, REMKO ALBERT;
IMHOF-JUNG, SABINE;
KAVLIE, ANITA;
KETTENBERGER, HUBERT;
KLEIN, CHRISTIAN;
REGULA, JOERG THOMAS;
SCHAEFER, WOLFGANG;
SCHANZER, JUERGEN MICHAEL;
SCHEUER, WERNER;
SEEBER, STEFAN y
THOMAS, MARKUS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 455 217 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

Anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/ anti-ANG-2

5 La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos contra el factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF / VEGF-A) y contra la angiopoyetina-2 humana (Ang-2), los métodos para su producción, las composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, y las utilidades de los mismos.

10 Antecedentes de la invención

10 La angiogénesis está implicada en la patogénesis de una variedad de trastornos, lo que incluye los tumores sólidos, síndromes neovasculares intraoculares tales como las retinopatías proliferativas o la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la artritis reumatoide y la psoriasis (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu Rev. Physiol 53 (1991) 217-239; y Garner, A., Vascular diseases, en: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., y Klintworth, GK (Ed.), 2^a edición, Marcel Dekker, Nueva York (1994), págs. 1625-1710). En el caso de tumores sólidos, la neovascularización permite que las células tumorales adquieran una ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa en comparación con las células normales. De acuerdo con ello, se ha observado una correlación entre la densidad de los microvasos en las secciones de tumor y la supervivencia del paciente en el cáncer de mama, así como en varios tumores distintos (Weidner, N., et al, N Engl J Med. 324 (1991) 1-8; Horak, ER, et al, Lancet 340 (1992) 1120-1124; Macchiarini y, P., et al, Lancet 340 (1992) 145-146).

VEGF y anticuerpos anti-VEGF

25 El factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF/ VEGF-A) (Id. De sec. N°: 105) se describe en, por ejemplo Leung, DW, et al, Science 246 (1989) 1306-9; Keck, PJ et al., Science 246 (1989) 1309-1312 y Connolly, DT, et al, J. Biol. Chem 264 (1989) 20017-24. El VEGF está implicado en la regulación de la angiogénesis y la neovascularización normal y anormal asociada con tumores y trastornos intraoculares (Ferrara, N., et al, Endocr Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, RA, et al, J Clin Invest 91 (1993) 153-159; Brown, LF, et al, Pathol humano 26 (1995) 86-91; Brown, LF, et al, Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J, et al, Brit. J. Cancer 73 (1996) 931-934; y Dvorak, H., et al, Am. J. Pathol 146 (1995) 1029-1039). El VEGF es una glucoproteína homodimérica que se ha aislado de varias fuentes. El VEGF muestra una actividad mitógena altamente específica de las células endoteliales. El VEGF tiene importantes funciones reguladoras en la formación de nuevos vasos sanguíneos durante la vasculogénesis embrionaria y en la angiogénesis durante la vida adulta (Carmeliet, P., et al, Nature, 380 (1996) 435-439; Ferrara, N., et al, Nature, 380 (1996) 439-442; revisado en Ferrara y Davis-Smyth, Endocrine Rev., 18 (1997) 4-25. La importancia del papel que desempeña el VEGF se ha demostrado en estudios que muestran que la inactivación de un solo alelo de VEGF resulta en letalidad embrionaria debido a un fallo de desarrollo de la vasculatura (Carmeliet, P., et al., Nature, 380 (1996) 435-439; Ferrara, N., et al., Nature, 380 (1996) 439-442. Además, el VEGF tiene una fuerte actividad quimiotáctica hacia los monocitos, puede inducir el activador del plasminógeno y el inhibidor del activador del plasminógeno en las células endoteliales, y también puede inducir la permeabilidad microvascular. Debido a esta última actividad, en ocasiones se le conoce como factor de permeabilidad vascular (VPF). El aislamiento y las propiedades del VEGF se han revisado, véase Ferrara, N., et al, J. Cellular Biochem, 47 (1991) 211-218 y Connolly, J. Cellular Biochem, 47 (1991) 219-223. El corte y empalme alternativo del mRNA de un sólo gen de VEGF da lugar a cinco isoformas de VEGF.

45 Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF suprimen el crecimiento de una variedad de líneas celulares de tumores humanos en ratones (Kim, I., et al., Nature 362 (1993) 841-844; Warren, SR, et al, J. Clin Invest. 95 (1995) 1789-1797; Borgstrom, P., et al, Cancer Res. 56 (1996) 4032-4039; y Melnyk, O., et al, Cancer Res. 56 (1996) 921-924). Las patentes WO 94/10202, WO 98/45332, WO 2005/00900 y WO 00/35956 se refieren a anticuerpos contra el VEGF. El anticuerpo monoclonal humanizado bevacizumab (vendido bajo el nombre comercial Avastin®) es un anticuerpo anti-VEGF utilizado en la terapia tumoral (WO 98/45331).

55 El ranibizumab (nombre comercial Lucentis®) es un fragmento de anticuerpo monoclonal derivado del mismo anticuerpo murino parental que el bevacizumab (Avastin). Es mucho más pequeño que la molécula original y se ha madurado por afinidad para proporcionar una unión más fuerte al VEGF-A (WO 98/45331). Es un antiangiogénico que se ha aprobado para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) de tipo "húmedo", una forma común de pérdida de visión relacionada con la edad. Otro anticuerpo anti-VEGF es, por ejemplo, el HuMab G6-31 que se describe, por ejemplo, en la patente US 2007/0141065.

60 ANG-2 y anticuerpos anti-ANG-2

65 La angiopoyetina-2 humana (Ang-2) (abreviada alternativamente con ANGPT2 o ANG2) (Id. de sec. N°: 106) se describe en Maisonpierre, PC, et al, Science 277 (1997) 55-60 y Cheung, AH, et al., Genomics 48 (1998) 389-91. Las angiopoyetinas-1 y -2 (ANG-1 (Id. de sec. N°: 107) y Ang-2 (Id. de sec. N°: 106)) se descubrieron como ligandos para las Tie, una familia de quinasas de tirosina que se expresa selectivamente en el endotelio vascular

(Yancopoulos, GD, et al., Nature 407 (2000) 242-48). En la actualidad existen cuatro miembros definitivos de la familia de angiopoyetinas. La angiopoyetina-3 y -4 (Ang-3 y Ang-4) pueden representar homólogos ampliamente divergentes de un mismo locus génico en ratón y el hombre (Kim, I., et al, FEBS Lett, 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al, J. Biol. Chem. 274 (1999) 26523-28). Ang-1 y Ang-2 se identificaron originalmente en experimentos de cultivo de tejidos como agonista y antagonista, respectivamente (véase, para ANG-1: Davis, S., et al, Cell 87 (1996) 1161-1169, y de ANG-2: Maisonpierre, PC, et al, Science 277 (1997) 55-60). Todas las angiopoyetinas conocidas se unen principalmente a Tie2, y tanto Ang-1 como -2 se unen a Tie2 con una afinidad de 3 nM (Kd) (Maisonpierre, PC, y col., Science 277 (1997) 55-60. Se demostró que ANG-1 apoya la supervivencia de las CE y promueve la integridad del endotelio, Davis, S., et al, Cell 87 (1996) 1161-1169; Kwak, HJ, et al, FEBS Lett 448 (1999) 249-53; Suri, C., et al, Science 282 (1998) 468-71; Thurston, G., et al, Science 286 (1999) 251 1-14; Thurston, G., et al, Nat. Med. 6 (2000) 460-63, mientras que Ang-2 poseía el efecto opuesto y promueve la desestabilización y la regresión de los vasos sanguíneos en ausencia de los factores de supervivencia VEGF o factor de crecimiento de fibroblastos básico (Maisonpierre, PC, y col., Science 277 (1997) 55-60. Sin embargo, muchos estudios de la función de ANG-2 han sugerido una situación más compleja. ANG-2 podría ser un regulador complejo del remodelado vascular que juega un papel tanto en la aparición de los vasos como en su regresión. Apoyando estos papeles de Ang-2, el análisis de su expresión revela que Ang-2 se induce rápidamente, junto con el VEGF, en el contexto de un adulto de aparición angiogénica, mientras que Ang-2 se induce en ausencia de VEGF en el contexto de la regresión vascular (Holash, J., et al, Science 284 (1999) 1994-1998; Holash, J., et al, Oncogene 18 (1999) 5356-62). De forma consistente con un papel dependiente del contexto, Ang-2 se une específicamente al mismo receptor específico del endotelio, Tie-2, que es activado por Ang-1, pero tiene efectos dependientes del contexto en su activación (Maisonpierre, PC, y col., Science 277 (1997) 55-60).

Los ensayos de angiogénesis de la córnea han demostrado que tanto ANG-1 y ANG-2 tuvieron efectos similares, actuando de forma sinérgica con el VEGF para promover el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. La posibilidad de que hubiera una respuesta endotelial dependiente de la dosis aumentó con la observación de que in vitro y a alta concentración, ANG-2 también puede ser proangiogénico. Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52. En altas concentraciones, ANG-2 actúa como un factor de supervivencia a la apoptosis en las células endoteliales durante la apoptosis por privación de suero mediante la activación de Tie2 a través de las vías de la PI-3 quinasa y Akt. Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52.

Otros experimentos in vitro sugirieron que durante la exposición sostenida, los efectos de ANG-2 pueden cambiar progresivamente de un antagonista a un agonista de Tie2, y en posteriormente, puede contribuir directamente a la formación del tubo vascular y la estabilización de nuevos vasos. Teichert - Kuliszewska, K., et al., Cardiovasc. Res. 49 (2001) 659-70. Además, si las CE se cultivaban sobre gel de fibrina, también se observó la activación de Tie2 con ANG-2, lo que tal vez sugiere que la acción de ANG-2 podría depender del estado de diferenciación de las CE. Teichert-Kuliszewska, K., et al., Cardiovasc. Res. 49 (2001) 659-70. En CE microvasculares cultivadas en un gel de colágeno tridimensional, ANG-2 también puede inducir la activación de Tie2 y promover la formación de estructuras similares a capilares. Mochizuki, Y., et al., J. Cell. Sci. 115 (2002) 175-83. El uso de un co-cultivo esférico 3-D como un modelo in vitro de la maduración de los vasos demostró que el contacto directo entre las CE y las células mesenquimales suprime la capacidad de respuesta a VEGF, mientras que la presencia de VEGF y ANG-2 indujeron la multiplicación. Korff, T., et al., FASEB J. 15 (2001) 447-57. Etoh, T. H. et al. demostró que en las CE que expresan de forma constitutiva Tie2, la expresión de MMP-1, -9 y u-PA estaba fuertemente regulada positivamente por ANG-2 en presencia de VEGF. Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53. Con un modelo in vivo de la membrana pupilar, Lobov, IB et al. demostraron que ANG-2 en presencia del VEGF endógeno promueve un rápido aumento del diámetro capilar, la remodelación de la lámina basal, la proliferación y migración de las células endoteliales y estimula la creación de nuevos vasos sanguíneos. Lobov, I.B., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99 (2002) 11205-10. Por el contrario, ANG-2 promueve la muerte de las células endoteliales y la regresión de los vasos sin VEGF endógeno. Lobov, I.B., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99 (2002) 11205-10. Del mismo modo, con un modelo in vivo de tumores, Vajkoczy, P., et al. demostraron que los agregados multicelulares inician el crecimiento vascular por mediante creación angiogénica a través de la expresión simultánea de VEGFR-2 y ANG-2 por el endotelio del huésped y del tumor. Vajkoczy, P., et al., J. Clin. Invest. 109 (2002) 777-85. Este modelo ilustra que la microvasculatura establecida de los tumores de crecimiento se caracteriza por una remodelación continua, supuestamente mediada por la expresión de VEGF y ANG-2. Vajkoczy, P., et al., J. Clin. Invest. 109 (2002) 777-85.

Los estudios de ratones con deficiencia de Tie-2 (*knock-out*) y angiopoyetina-1 muestran fenotipos similares y sugieren que la fosforilación de Tie-2 estimulada por la angiopoyetina-1, interviene en la remodelación y la estabilización de los vasos en desarrollo, la promoción de la maduración de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis y el mantenimiento de las adhesión celular de apoyo de las células endoteliales (Dumont, J., et al, Genes & Development, 8 (1994) 1897-1909; Sato, TN, Nature, 376 (1995) 70-74; (Thurston, G., et al, Nature Medicine: 6 (2000) 460-463). Se cree que el papel de la angiopoyetina-1 se conserva en el adulto, en el que se expresa ampliamente y constitutivamente (Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50; Zagzag, D., et al., Exp. Neurology, 159:391-400 (1999). Por el contrario, la expresión de la angiopoyetina-2 se limita principalmente a los sitios de remodelado vascular, donde se cree que bloquea la estabilización constitutiva o función de maduración de la angiopoyetina-1, lo que permite que los vasos se reviertan, y permanezcan en un estado de plasticidad en el que pueden ser más sensibles a las señales de creación de vasos (Hanahan, D., 1997; Holash, J., et al, Orzcogerze 18

(199) 5356-62; Maisonpierre, PC, 1997). Los estudios de la expresión de angiopoyetina-2 en la angiogénesis patológica han encontrado que muchos tipos de tumores muestran expresión de la angiopoyetina-2 vascular (Maisonpierre, PC, y col., *Science* 277 (1997) 55-60). Los estudios funcionales sugieren que la angiopoyetina-2 está implicada en la angiogénesis tumoral y asocian la sobreexpresión de la angiopoyetina-2 con un aumento del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón (Ahmad, SA, et al., *Cancer Res.*, 61 (2001) 1255-1259). Otros estudios han asociado la sobreexpresión de angiopoyetina-2 con la hipervascularidad de un tumor (EtOH, T., et al, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53; Tanaka, F., et al, *Cancer Res.* 62 (2002) 124-29).

En los últimos años la angiopoyetina-1, angiopoyetina-2 y/o Tie-2 se han propuesto como posibles dianas terapéuticas contra el cáncer. Por ejemplo las patentes US 6.166.185, US 5.650.490 y US 5.814.464 describen cada una de ellas anticuerpos anti-ligando Tie-2 y receptor. Se ha descrito en estudios que utilizan Tie-2 soluble que se reduce el número y tamaño de los tumores en roedores (Lin, 1997; Lin 1998). Siemester, G., et al. Siemester, G., et al, *Cancer Res.* 59 (1999) 3185-91, generó líneas celulares de melanoma humano que expresaban el dominio extracelular de Tie-2, las inyectaron en ratones desnudos e informaron de que Tie-2 soluble resulta en una inhibición significativa del crecimiento tumoral y de la angiogénesis tumoral. Dado que tanto la angiopoyetina-1 como la angiopoyetina-2 se unen a Tie-2, no queda claro en estos estudios si la angiopoyetina-1, angiopoyetina-2 o Tie-2 serían una diana atractiva para la terapia contra el cáncer. Sin embargo, se cree que la terapia anti-angiopoyetina-2 eficaz sería beneficiosa para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, en las que la progresión depende de la angiogénesis aberrante, donde el bloqueo del proceso puede conducir a la prevención del avance de la enfermedad (Follunan, J., *Nature Medicine.* 1 (1995) 27-31).

Además, algunos grupos han informado de la utilización de anticuerpos y péptidos que se unen a la angiopoyetina-2. Véase, por ejemplo, las patentes US 6 166 185 y US 2003/10124129, y WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 03/057134 o US 2006/0122370.

El estudio del efecto de la expresión focal de angiopoyetina-2 ha demostrado que antagonizar la señal angiopoyetina-1/ Tie-2 debilita la fuerte estructura vascular, exponiéndose de este modo las CE a las señales de activación de los inductores de angiogénesis, por ejemplo, el VEGF (Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50). Este efecto proangiogénico resultante de la inhibición de la angiopoyetina-1 indica que la terapia anti-angiopoyetina-1 no sería un tratamiento eficaz contra el cáncer.

ANG-2 se expresa durante el desarrollo en los sitios donde se está produciendo la remodelación de los vasos sanguíneos. Maisonpierre, PC, et al., *Science* 277 (1997) 55-60. En los individuos adultos, la expresión de Ang-2 está restringida a los sitios de remodelación vascular, así como en los tumores altamente vascularizados, incluyendo el glioma, Osada, H., et al., *Int. J. Oncol.* 18(2001) 305-09; Koga, K., et al, *Cancer Res.* 61(2001) 6248-54, carcinoma hepatocelular, Tanaka, S., et al., *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45, carcinoma gástrico, Etoh, T., et al., *Cancer Res.* 61(2001) 2145-53; Lee, J. H., et al, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 355-61, tumor de tiroides, Bunone, G., et al., *Am J Pathol* 155 (1999) 1967-1976, cáncer de pulmón de células no pequeñas, Wong, MP, et al., cáncer de pulmón 29 (2000) 11-22, y el cáncer de colon, Ahmad, SA, et al., *Cancer* 92 (2001) 1138-1143, y de próstata, Wurmbach, JH, et al., *Anticancer Res.* 20 (2000) 5217-20. Se ha descubierto que algunas células tumorales expresan ANG-2. Por ejemplo, Tanaka, S., et al., *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45 detectan el mRNA de ANG-2 en 10 de 12 muestras de carcinoma hepatocelular humano (HCC). El grupo de Ellis informó de que ANG-2 se expresa de forma ubicua en el epitelio tumoral. Ahmad, S. A., et al., *Cancer* 92 (2001) 1138-1143. Otros investigadores han informado de hallazgos similares. Chen, L., et al., *J. Tongji. Med. Univ.* 21 (2001) 228-35. Mediante la detección de los niveles del mRNA de Ang-2 en especímenes archivados de cáncer de mama humano, Sfiligoj, C., et al., *Int. J. Cancer* 103 (2003) 466-74 demostró que el mRNA de la ANG-2 se asocia significativamente con la invasión ganglionar auxiliar, un periodo corto libre de enfermedad y baja supervivencia global. Tanaka, F., et al., *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29 revisó un total de 236 pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estadio patológico de I-IIIa, respectivamente. Utilizando inmunohistoquímica, encontraron que el 16,9% de los pacientes con NSCLC eran ANG-2 positivos. La densidad de los microvasos de los tumores positivos para ANG-2 es significativamente mayor que la de los ANG-2 negativos. Tal efecto angiogénico de ANG-2 se observó sólo cuando la expresión de VEGF era elevada. Por otra parte, la expresión positiva de ANG-2 era un factor significativo para predecir una baja supervivencia postoperatoria. Tanaka, F., et al., *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29. Sin embargo, no se encontró ninguna correlación significativa entre la expresión de Ang-1 y la densidad de los microvasos. Tanaka, F., et al., *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29. Estos resultados sugieren que la Ang-2 es un indicador de los pacientes con mal pronóstico en varios tipos de cáncer.

Recientemente, utilizando un modelo de ratón deficiente en ANG-2, el grupo de Yancopoulos informó de que ANG-2 es necesario para la angiogénesis postnatal. Gale, N.W., et al., *Dev. Cell* 3 (2002) 411-23. Demostraron que la regresión programada durante el desarrollo de la vasculatura hialoidea en el ojo no se produce en los ratones deficientes en ANG-2 y dejan de generarse vasos sanguíneos de la retina desde la arteria central de la retina. Gale, N.W., et al., *Dev. Cell* 3 (2002) 411-23. También encontraron que la delección de ANG-2 resulta en profundos defectos en el patrón y la función de la vasculatura linfática. Gale, N.W., et al., *Dev. Cell* 3 (200) 411-23. El rescate genético con ANG-1 corrige los defectos linfáticos, pero no los defectos de la angiogénesis. Gale, N.W., et al., *Dev. Cell* 3 (2002) 411-23.

Peters y sus colegas informaron de que cuando se liberaba Tie2 soluble, ya sea como proteína recombinante o en un vector de expresión viral, inhibía el crecimiento *in vivo* del carcinoma mamario murino y el melanoma en modelos de ratón. Lin, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8829-34; Lin, P., et al, J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78. Las densidades vasculares en los tejidos tumorales así tratados se redujeron en gran medida. Además, Tie2 soluble bloqueó la angiogénesis en la córnea de rata estimulada con medios acondicionados con células tumorales. Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78. Además, Isner y su equipo demostraron que la adición de ANG-2 a VEGF promueve una neovascularización significativamente más larga y más circunferencial que VEGF sólo. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. El exceso de receptor Tie2 soluble evitó la modulación por parte de ANG-2 de la neovascularización inducida por el VEGF. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59 (1999) 3185-91 demostró con xenoinjertos de ratón desnudo que la sobreexpresión de los dominios de unión a ligandos extracelulares de Flt-1 o Tie2 en los xenoinjertos, que resultaba en una inhibición significativa de la vía, no podía compensarse con el otro, lo que sugiere que la vía del receptor de VEGF y la vía de Tie2 deben considerarse dos mediadores independientes esenciales para el proceso de la angiogénesis *in vivo*. Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59: 3 (1999) 3185-91. Esto se demuestra en una publicación más reciente de White, R., R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5028-33. En ese estudio, se demostró que un aptámero de RNA resistente a las nucleasas que se une e inhibe específicamente ANG-2, inhibía significativamente la neovascularización inducida por bFGF en el modelo de angiogénesis en un microbolsillo de córnea de rata.

20 Anticuerpos biespecíficos

Últimamente se han desarrollado una amplia variedad de formatos de anticuerpos recombinantes, por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos tetravalentes por fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena sencilla (véase, por ejemplo Coloma, MJ, et al, Nature Biotech 15 (1997) 159-163, el documento WO 2001/077342, y Morrison, SL, Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234).

También se han desarrollado otros nuevos formatos distintos en los que la estructura del núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) ya no se conserva como en los formatos de dia-, tria- o tetracuerpos, minicuerpos o varios formatos de cadena sencilla (scFv, Bis-scFv), que son capaces de unirse a dos o más antígenos (Holliger, P., et al, Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136, Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14, Shen, J., et al, Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74, Wu, C., et al, Nature Biotech 25 (2007) 1290-1297).

Todos estos formatos utilizan enlazadores ya sea para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) a una proteína de unión adicional (por ejemplo, scFv) o para fusionar por ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv (Fischer, N., Léger, O., Biopathology 74 (2007) 3-14). Hay que tener en cuenta que puede ser deseable retener las funciones efectoras, como por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), que están mediadas a través de la unión al receptor Fc, manteniendo un alto grado de similitud con los anticuerpos de origen natural .

En el documento WO 2007/024715 se informa de las inmunoglobulinas de dominio variable dual como proteínas de unión modificadas multispecíficas y polivalentes. Un procedimiento para la preparación de dímeros de anticuerpo biológicamente activos se informó en la US 6.897.044. Una construcción de anticuerpo Fv multivalente que tiene al menos cuatro dominios variables que están unidos entre ellos a través de enlazantes peptídicos se describen en la US 7.129.330. Las estructuras dimericas y multiméricas de unión de antígeno se describen en la US 2005/0079170. La proteína de unión a antígeno mono específica tri- o tetravalente que comprende tres o cuatro fragmentos Fab unidos entre sí de manera covalente por una estructura de conexión, cuya proteína no es una inmunoglobulina natural se describen en la US 6.511.663. En la WO 2006/020258 se informa de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes que pueden expresarse de manera eficiente en células procariontas y eucariotas, y que son útiles en métodos terapéuticos y de diagnóstico. En la US 2005/0163782 se describió un método para sintetizar de forma preferente o separar los dímeros que están unidos a través de al menos un enlace disulfuro entre cadenas, de los dímeros que no estén unidos a través de al menos un enlace disulfuro entre cadenas de entre una mezcla que comprende los dos tipos de dímeros de polipéptido. Los receptores tetravalentes biespecíficos se describen en la US 5.959.083. Los anticuerpos modificados con tres o más sitios de unión de antígeno funcionales se presentan en la WO 2001/077342.

Los polipéptidos de unión a antígenos multivalentes y multispecíficos se describen en la WO 1997/001580. La patente WO 1992/004053 informa de homoconjugados, típicamente preparados a partir de anticuerpos monoclonales de clase IgG que se unen al mismo determinante antigénico y que están unidos covalentemente por entrecruzamiento sintético. Los anticuerpos monoclonales oligoméricos con gran afección por el antígeno se describen en la WO 1991/06305, en la que los oligómeros, típicamente de la clase IgG, se secretan con dos o más monómeros de inmunoglobulina asociados entre sí para formar moléculas de IgG tetravalentes o hexavalentes. En la US 6.350.860 se describen anticuerpos derivados de oveja y construcciones de anticuerpos modificados, que pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades en las que la actividad del interferón gamma es patogénica. En la US 2005/0100543 se reportan construcciones dirigibles que son portadores multivalentes de anticuerpos biespecíficos, es decir, cada molécula de una construcción dirigible puede servir como portador de dos o más anticuerpos

biespecíficos. En la WO 1995/ 009917 se describen los anticuerpos tetravalentes biespecíficos modificados mediante ingeniería genética. En la WO 2007/109254 se reportan moléculas de unión estabilizadas que contengan o consistan en un scFv estabilizado.

5 Combinación de inhibidores de VEGF y ANG-2

La WO 2007/068895 se refiere a una combinación de un antagonista de la ANG-2 y un VEGF, KDR y/o antagonistas de FLTL. La WO 2007/089445 se refiere a combinaciones de inhibidores de ANG-2 y VEGF.

10 La WO 2003/106501 se refiere a proteínas de fusión que se unen a angiopoyetina y que contienen un dominio de multimerización. La WO 2008/132568 describe proteínas de fusión de unión a angiopoyetina y a VEGF.

Jendreyko et al. (Klinische Pädiatrie, vol. 218 (2006) 143-151) describen un anticuerpo Fv de cadena sencilla biespecífico contra el VEGF-R2 y Tie-2, el receptor de la angiopoyetina-2.

15 Resumen de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es un anticuerpo biespecífico tal como se define en las reivindicaciones, que se une específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF) y la angiopoyetina-2 humana (Ang-2), que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a la ANG-2 humana .

20 El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza en que ii) dicho primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF comprende en el dominio variable de la cadena pesada, una región CDR3 de Id de Sec. N° 1, una región CDR2 de Id de Sec. N° 2, y una región CDR1 de Id de Sec. N° 3, y en el dominio variable de la cadena ligera, una región CDR3 de Id de Sec. N° 4, una región CDR2 de Id de Sec. N° 5, y una región CDR1 de Id de Sec. N° 6, y iii) dicho segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a ANG-2 comprende en el dominio variable de la cadena pesada, una región CDR3 de Id de Sec. N° 46, una región CDR2 de Id de Sec. N° 47, y una región CDR1 de Id de Sec. N° 48, y en el dominio variable de cadena ligera, una región CDR3 de Id de Sec. N° 49, una región CDR2 de Id de Sec. N° 50 y una región CDR1 de Id de Sec. N° 51.

El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es bivalente.

35 Un aspecto adicional de la invención es una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena de dicho anticuerpo biespecífico.

La invención proporciona además vectores de expresión que contienen dicho ácido nucleico de acuerdo con la invención, capaces de expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped procariota o eucariota, y células huésped que contienen tales vectores para la producción recombinante de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La invención comprende además una célula huésped procariota o eucariota que comprende un vector de acuerdo con la invención.

45 La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, que se caracteriza por la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula huésped procariota o eucariota, y la recuperación de dicho anticuerpo biespecífico a partir de dicha célula o del sobrenadante de su cultivo celular. La invención comprende además el anticuerpo obtenido mediante tal método recombinante.

50 Otros aspectos adicionales de la invención son una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico, dicha composición para el tratamiento del cáncer, el uso de dicho anticuerpo biespecífico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer y un método para el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer mediante la administración de dicho anticuerpo biespecífico a un paciente en necesidad de tal tratamiento.

Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención aportan beneficios en los pacientes humanos con la necesidad de una terapia contra VEGF y ANG-2. Los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen propiedades nuevas e inventivas que provocan un beneficio para un paciente que sufre tal enfermedad, especialmente que sufre de cáncer. Sorprendentemente, se ha descubierto que los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención son más eficaces en el crecimiento tumoral y/o la inhibición de la angiogénesis del tumor comparado con la combinación de los respectivos anticuerpos parentales mono-específicos.

65 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un anticuerpo biespecífico como el que se define en las reivindicaciones, que se une específicamente a VEGF humano y ANG-2 humana, que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente al VEGF humano y un segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a ANG-2 humana, caracterizado porque i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de ellos un par de dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo y dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo, ii) dicho primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF comprende en el dominio variable de la cadena pesada, una región CDR3 de Id de Sec. N° 1, una región CDR2 de Id de Sec. N° 2, y una región CDR1 de Id de Sec. N° 3, y en el dominio variable de la cadena ligera, una región CDR3 de Id de Sec. N° 4, una región CDR2 de Id de Sec. N° 5, y una región CDR1 de Id de Sec. N° 6, y iii) dicho segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a ANG-2 comprende en el dominio variable de la cadena pesada, una región CDR3 de Id de Sec. N° 46, una región CDR2 de Id de Sec. N° 47, y una región CDR1 de Id de Sec. N° 48, y en el dominio variable de cadena ligera, una región CDR3 de Id de Sec. N° 49, una región CDR2 de Id de Sec. N° 50 y una región CDR1 de Id de Sec. N° 51.

El anticuerpo parental, Ang2i_LC06, se une específicamente a la ANG-2 humana, pero no a la ANG-1 humana.

Los anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF) y la angiopoyetina-2 humana (ANG-2), pero no la a ANG-1 humana pueden tener propiedades mejoradas, como por ejemplo, su actividad biológica o farmacológica, menos toxicidad, o su perfil farmacocinético, comparado con los anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF) y la angiopoyetina-2 humana (ANG-2), así como la ANG-1 humana.

Por lo tanto una realización preferible es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al VEGF humano y la ANG-2 humana y que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente al VEGF humano y un segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a ANG-2 humana, caracterizado porque ese segundo sitio de unión al antígeno no se une específicamente a la angiopoyetina humana 1 (ANG-1).

Una realización de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF) y la angiopoyetina-2 humana (ANG-2) y que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente al VEGF humano, y un segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a ANG-2 humana, caracterizado porque la relación entre las afinidades de unión KD (sitio de unión al antígeno específico de VEGF) / KD (sitio de unión a antígeno específico de ANG-2) es de 1,0 a 10,0, preferiblemente de 1,5 a 8,0 (en una realización de 5,0 a 8,0) y, preferiblemente, el valor absoluto de KD está en el rango de 10^{-8} a 10^{-13} mol/l. Los valores de KD se determinan en un BIACORE de unión a ANG-2/VEGF (véase el Ejemplo 2, y la Fig. 15A). Como ambas proteínas, VEGF humano y ANG-2 humana, están presentes como ligandos receptores solubles en el suero humano en aproximadamente las mismas concentraciones, el bloqueo de dichos ligandos receptores mediante un biespecífico, caracterizado porque la relación entre las afinidades de unión KD (sitio de unión a antígeno específico de VEGF) / KD (sitio de unión al antígeno específico de ANG-2) es de 1,0 a 10,0, preferiblemente de 1,5 a 8,0, y en una realización de 5,0 a 8,0, puede dar lugar a propiedades mejoradas respecto a los efectos antiangiogénicos, la inhibición del crecimiento del tumor o el mecanismo de resistencia durante el tratamiento del cáncer o de enfermedades vasculares con tal anticuerpo biespecífico. Preferiblemente, dicho anticuerpo biespecífico caracterizado porque la relación de las afinidades de unión KD (sitio de unión al antígeno específico de VEGF) / KD (sitio de unión al antígeno específico de ANG-2) es de 1,0 a 10,0, preferiblemente de 1,5 a 8,0 (en una realización de 5,0 a 8,0) y dicho anticuerpo biespecífico comprende como primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF, un dominio variable de la cadena pesada de Id de Sec. N° 7, y un dominio variable de la cadena ligera de Id de Sec. N° 8, como dicho segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a ANG-2 a) de un dominio variable de la cadena pesada de Id de Sec. N° 52, y un dominio variable de la cadena ligera de Id de Sec. N° 53 o b) un dominio variable de la cadena pesada de Id de Sec. N° 84, y un dominio variable de la cadena ligera de Id de Sec. N° 85.

Como se utiliza aquí, "anticuerpo" se refiere a una proteína de unión que comprende sitios de unión al antígeno. Los términos "sitio de unión" o "sitio de unión al antígeno" tal como se utilizan aquí, indican la(s) región(es) de una molécula de anticuerpo a la que un ligando se une realmente. El término "sitio de unión a antígeno" incluye los dominios variables de la cadena pesada del anticuerpo (VH) y/o los dominios variables de la cadena ligera del anticuerpo (VL), o pares de VH/ VL, y se puede derivar a partir de anticuerpos enteros o fragmentos de anticuerpo, como un Fv de cadena sencilla, un dominio VH y/o un dominio VL, un Fab, o (Fab)₂. En una realización de la presente invención cada uno de los sitios de unión a antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH) y/o un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo de (VL), y preferiblemente está formada por un par que consiste en un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) y un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH).

El sitio de unión a antígeno, y especialmente los dominios variables de la cadena pesada (VH) y/o los dominios variables de la cadena ligera de anticuerpo (VL), que se unen específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF) se pueden derivar a) a partir de anticuerpos conocidos anti-VEGF, como Kim et al., Nature 362 (1993) 841-844; Warren, RS, et al., J. Clin. Invest. 95 (1995) 1789-1797; Borgstrom, P., et al., Cancer Res. 56 (1996) 4032-4039; Melynk, O., et al., Cancer Res. 56 (1996) 921-924. Las patentes WO 94/10202, WO 98/45332,

WO 2005/00900, WO 00/35956 y US 2007/0141065, o b) a partir de nuevos anticuerpos anti-VEGF obtenidos mediante métodos de inmunización *de novo* que utilizan entre otros, la proteína del VEGF humano, o ácido nucleico o fragmentos de los mismos o mediante presentación en fagos.

5 El sitio de unión a antígeno, y especialmente los dominios variables de la cadena pesada (VH) y/o los dominios variables de la cadena ligera del anticuerpo (VL), que se unen específicamente a la angiopoyetina-2 humana (ANG-2) pueden derivarse a) a partir de anticuerpos conocidos anti-ANG-2 como los de la WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 2006/045049, o US 6.166.185, o b) a partir de nuevos anticuerpos anti-ANG-2, por ejemplo, obtenidos mediante métodos de inmunización *de novo*, utilizando entre otros, la proteína humana ANG-2 o el ácido nucleico o fragmentos de los mismos, o mediante presentación en fagos .

La especificidad del anticuerpo se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo de un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos.

15 Los "anticuerpos biespecíficos", de acuerdo con la invención son anticuerpos que tienen dos especificidades de unión a antígeno diferentes. Cuando un anticuerpo tiene más de una especificidad, los epítopos reconocidos pueden estar asociados con un solo antígeno o con más de un antígeno. Los anticuerpos de la presente invención son específicos para dos antígenos diferentes, es decir, el VEGF como primer antígeno y ANG-2 como segundo antígeno.

20 El término anticuerpo "monoespecífico" tal como se utiliza aquí denota un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión, y cada uno de ellos se une al mismo epítipo del mismo antígeno. El término "valente" tal como se utiliza en la actual aplicación indica la presencia de un número especificado de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Como tal, los términos "bivalente", "tetraivalente" y "hexavalentes" denotan la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención son al menos "bivalentes" y pueden ser "trivalentes" o "multivalentes" (por ejemplo, ("tetraivalentes" o "hexavalentes"). El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es bivalente.

30 El factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF/VEGF-A) (Id. De Sec. N° 105) se describe en, por ejemplo, Leung, DW, et al., Science 246 (1989) 1306-9; Keck, PJ et al., Science 246 (1989) 1309-1312, y Connolly, DT, et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24. El VEGF está implicado en la regulación de la angiogénesis normal y anormal y de la neovascularización asociada con los tumores y los trastornos intraoculares (Ferrara, N., et al., Endocr Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, RA, et al., J. Clin Invest 91 (1993) 153-159; Brown, LF, et al, Human Pathol 26 (1995) 86-91; Brown, LF, et al., Cancer Res. 53 (1993) 4.727-4.735; Mattern, J., et al, Brit. J. Cancer 73 (1996) 931-934; y Dvorak, H., et al., Am. J. Pathol 146 (1995) 1029-1039). El VEGF es una glicoproteína homodimérica que se ha aislado de varias fuentes. El VEGF muestra una actividad mitógena muy específica para las células endoteliales.

40 La angiopoyetina-2 humana (ANG-2) (alternativamente abreviada con ANGPT2 o ANG2) (Id. de Sec. N° 106) se describe en Maisonpierre, PC, et al., Science 277 (1997) 55-60 y Cheung, AH, et al., Genomics 48 (1998) 389-91. Las angiopoyetinas-1 y -2 (ANG-1 (Id. de Sec. N° 107) y ANG-2 (Id. de Sec. N° 106)) se descubrieron como ligandos para los Tie, una familia de quinasas de tirosina que se expresa selectivamente en el endotelio vascular. Yancopoulos, GD, et al., Nature 407 (2000) 242-48. En la actualidad hay cuatro miembros definitivos de la familia de angiopoyetina. La angiopoyetina-3 y -4 (ANG-3 y ANG-4) pueden representar homólogos ampliamente divergentes de un mismo locus del gen en el ratón y el hombre. Kim, I., et al, FEBS Let, 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al, J. Biol. Chem. 274 (1999) 26523-28. ANG-1 y ANG-2 se identificaron originalmente en experimentos de cultivo de tejidos como agonista y antagonista, respectivamente (véase, para ANG-1: Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-1169, y para ANG-2: Maisonpierre, PC et al., Science 277 (1997) 55-60). Todas las angiopoyetinas conocidas se unen principalmente a Tie2, y tanto Ang-1 como -2 se unen a Tie2 con una afinidad de 3 nM (Kd). Maisonpierre, PC, et al., Science 277 (1997) 55-60.

55 Un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención contiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en distinto grado a la afinidad del sitio de unión por el antígeno. Hay tres CDR del dominio variable de la cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR del dominio variable de la cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las regiones CDR y marco (FR) se determina por comparación con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos en las que estas regiones se han definido de acuerdo con la variabilidad entre las secuencias.

60 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden además regiones constantes de inmunoglobulina de una o más clases de inmunoglobulina. Las clases de inmunoglobulina incluyen IgG, IgM, IgA, IgD e isotipos IgE y, en el caso de IgG e IgA, sus subtipos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

65

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de un origen o especie, y al menos una porción de una región constante derivada de un origen o especie diferente, habitualmente preparado por técnicas de DNA recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana son los preferibles. Otras formas preferibles de "anticuerpos quiméricos" incluidos en la presente invención son aquellos en los que la región constante se ha modificado o cambiado a partir de la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en lo que se refiere a la unión de Clq y/o la unión del receptor Fc (FCR). Tales anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos con cambio de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de DNA que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de DNA que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de DNA recombinante y transfección génica que son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5.202.238 y US 5.204.244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que se han modificado las regiones marco o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad comparado con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferida, una CDR murina se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327, y Neuberger, MS, et al., Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferibles corresponden a las que representan secuencias que reconocen los antígenos anteriormente indicados para los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" incluidos en la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en lo que se refiere a la unión de Clq y/o la unión del receptor Fc (FCR).

El término "anticuerpo humano", como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la materia (van Dijk, MA, y van de Winkel, JG, Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia de la disposición de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana a tales ratones mutantes de la línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Brüggemann, M., et al, Year Immunol 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom, HR, y Winter, G., J. Mol Biol 227 (1992) 381-388; Marks, JD, et al, J. Mol Biol. 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole, A., et al. y Boerner, P., et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, A., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, AL, p 77 (1985); y Boerner, P., et al, J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Como ya se ha mencionado para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano", como se utiliza aquí también comprende los anticuerpos que están modificados en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en lo que se refiere a la unión de Clq y/o la unión de FcR, por ejemplo mediante "cambio de clase", es decir cambio o mutación de partes Fc (por ejemplo, de IgG1 a IgG4 y/o mutación IgG1/IgG4).

El término " anticuerpo humano recombinante", como se utiliza aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por métodos recombinantes, tales como los anticuerpos aislados a partir de una célula huésped como una célula NSO o CHO, o a partir de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para los genes de la inmunoglobulina humana o los anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen las regiones variables y constantes reordenadas. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a una hipermutación somática *in vivo*. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con las secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH) tal como se utiliza aquí denota cada uno de los pares de cadenas ligera y pesada que está implicado directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras humanos tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión al antígeno. Las regiones CDR3 de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos juegan un papel particularmente importante en la especificidad/ afinidad

de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por lo tanto proporcionan un objeto adicional de la invención.

5 Los términos "región hipervariable" o "porción de unión a antígeno de un anticuerpo" cuando se utilizan aquí se refieren a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "FR" o "marco" son aquellas regiones del dominio variable distintas a los residuos de la región hipervariable tal como se definen aquí. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden del extremo N- a C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR de cada cadena están separadas por dichos aminoácidos marco. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión del antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

15 Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención incluyen, además, dichos anticuerpos que tienen "modificaciones conservadoras de la secuencia" (lo que se entiende por "variantes" de los anticuerpos biespecíficos). Esto significa modificaciones en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos que no afectan o alteran las características anteriormente mencionadas del anticuerpo de acuerdo con la invención. Las modificaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar conocidas en la materia, como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la materia. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido que se predice no esencial en un anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2> puede ser sustituido preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

30 Un anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2> "variante", por lo tanto, se refiere aquí a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2> "parental" en hasta diez, preferiblemente de dos a alrededor de cinco, adiciones, supresiones y/o sustituciones en una o más regiones variables o constantes del anticuerpo parental. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse mediante mutagénesis basada en modelos moleculares como se ha descrito en Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327 y Queen, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10.029-10.033. Un anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2> "variante" según la invención incluye también formatos de anticuerpos biespecíficos en los que el enlazante (si existe) se ha modificado o sustituido por otro enlazante.

40 Tal como se utiliza aquí, el término "unión" o "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno (ya sea VEGF humano o ANG-2 humana) en un ensayo *in vitro*, preferiblemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) (Ejemplo 2) con el antígeno de tipo salvaje purificado. La afinidad de unión se define por los términos k_a (constante de la tasa de asociación del anticuerpo en el complejo anticuerpo/ antígeno), k_D (constante de disociación), y KD (k_D/k_a). Unión o unión específica significa una afinidad de unión (KD) de 10^{-8} mol/l o menos, preferiblemente de 10^{-9} M a 10^{-13} mol/l .

45 La unión del anticuerpo a la $Fc\gamma RIII$ puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (GE Healthcare-Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define por los términos k_a (constante de la tasa de asociación del anticuerpo en el complejo anticuerpo/ antígeno), k_D (constante de disociación) y KD (k_D/k_a).

50 Como se utiliza aquí, el término "no unión a ANG-1" o "no se une específicamente a ANG-1" indica que el anticuerpo tiene un valor de CE_{50} por encima de 8.000 ng/ml en un ensayo ELISA de unión de ANG-1 *in vitro* (según el Ejemplo 9).

55 El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el determinante del epítipo incluye agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo, y en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo.

60 En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

65 En una realización de la invención, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo parental completo como esqueleto de su estructura.

El término "anticuerpo completo" se refiere a un anticuerpo que consiste en dos "cadenas pesadas del anticuerpo completo" y dos "cadenas ligeras del anticuerpo completo". Una "cadena pesada del anticuerpo completo" es un polipéptido que consiste en dirección de N-terminal a C-terminal de un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo 1 (CH1), una región bisagra del anticuerpo (HR), un dominio constante de la cadena pesada de anticuerpo 2 (CH2), y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 3 (CH3), abreviado como VH-CH1-HR-CH2-CH3, y opcionalmente una cadena pesada del anticuerpo de dominio constante 4 (CH4) en caso de un anticuerpo de la subclase de IgE. Preferiblemente, la "cadena pesada del anticuerpo completo" es un polipéptido que consiste de N-terminal a C-terminal de VH, CH1, HR, CH2 y CH3. Una "cadena ligera de anticuerpo completo" es un polipéptido que consiste de N-terminal a C-terminal de un dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo (CL), abreviado como VL-CL. El dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo (CL) puede ser κ (kappa) o λ (lambda). Las dos cadenas del anticuerpo completo están unidas entre sí a través de enlaces disulfuro interpolipeptídicos entre el dominio CL y el dominio CH1, y entre las regiones de bisagra de las cadenas pesadas de los anticuerpos completos. Ejemplos de anticuerpos completos típicos son anticuerpos naturales como IgG (por ejemplo IgG1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE.

Así, un anticuerpo bivalente mono-específico (= completo) que comprende un primer sitio de unión a antígeno y que consiste en dos cadenas ligeras de anticuerpo y dos cadenas pesadas de anticuerpo es un anticuerpo completo. El extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo completo denota el último aminoácido en el extremo C-terminal de dicha cadena pesada o ligera. El extremo N-terminal de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo completo denota el último aminoácido en el extremo N-terminal de dicha cadena pesada o ligera.

Los anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente al factor humano de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la angiopoyetina-2 humana (Ang-2) de acuerdo con la invención son anticuerpos bivalentes con dos especificidades diferentes, como por ejemplo, a) las descritas en las patentes WO 2009/080251, WO 2009/080252 o WO 2009/080253 (anticuerpos con intercambio de dominios - véase el Ejemplo 13) o b) basados en un anticuerpo de fusión scFab - Fc en el que un fragmento Fab de una sola cadena (eventualmente estabilizado con disulfuro) es un fragmento específico para el VEGF y el otro Fab de una sola cadena (eventualmente estabilizado con disulfuro) lo es para Ang-2 (véase el Ejemplo 14), o c) el que se describe en Ridgway, JB, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; la WO 96/027011; Merchant, AM, et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35 y la EP 1.870.459 A1.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por que comprende como secuencias de aminoácidos, la Id. de Sec. N°: 121, Id. de Sec. N°: 122, Id. de Sec. N°: 123 y Id. de Sec. N°: 124 o variantes de las mismas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza en que comprende como secuencias de aminoácidos, la Id. de Sec. N°: 125, Id. de Sec. N°: 126, Id. de Sec. N°: 127 y Id. de Sec. N°: 128 o variantes de las mismas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza en que comprende como secuencias de aminoácidos, la Id. de Sec. N°: 129, Id. de Sec. N°: 130, Id. de Sec. N°: 131 y Id. de Sec. N°: 132 o variantes de las mismas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza en que comprende como secuencias de aminoácidos, la Id. de Sec. N°: 133 y la Id. de Sec. N°: 134 o variantes de las mismas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza en que comprende como secuencias de aminoácidos, la Id. de Sec. N°: 135 y la Id. de Sec. N°: 136 o variantes de las mismas.

Estas secuencias de aminoácidos se basan en los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 7, y los dominios variables de la cadena ligera de la Id. de Sec. N°: 8 (derivados de bevacizumab (Avastin)) como primer sitio de unión a antígeno con unión a VEGF, y en los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 52, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 53 (derivado de Ang2i_LC06)) como segundo sitio de unión a antígeno con unión a Ang-2.

Los sitios de unión en un anticuerpo de acuerdo con la invención están formados cada uno de ellos por un par de dos dominios variables, es decir, de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera. El determinante del sitio de unión mínimo en un anticuerpo es la región CDR3 de la cadena pesada.

En una realización adicional dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante está derivada de origen humano.

En una realización adicional dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es de subclase IgG1 humana, o de subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A.

5 En una realización adicional, dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es el anticuerpo de la subclase IgG2 humana.

En una realización adicional dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es el anticuerpo de la subclase IgG3 humana.

10 En una realización adicional dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es de subclase IgG4 humana o de la subclase IgG4 humana con la mutación adicional S228P.

15 Ahora se ha descubierto que los anticuerpos biespecíficos contra VEGF humano y Ang-2 humana de acuerdo con la presente invención poseen características mejoradas tales como su actividad biológica o farmacológica, propiedades farmacocinéticas o toxicidad. Han demostrado incrementos en la inhibición del crecimiento de tumores *in vivo* y/o la inhibición de la angiogénesis tumoral comparada con los anticuerpos parentales mono-específicos contra VEGF y ANG-2 (véanse los ejemplos 16, 17 y 18: comparación de los diferentes anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> bevacizumab-ANG2i-LC06 con sólo los anticuerpos mono-específicos Avastin (bevacicumab), o sólo ANG21-LC06, o ambos en combinación).

20 Además, también representa una ventaja de los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención que muestran menos efectos secundarios tóxicos (lo que se refleja en la mejora del peso corporal de los animales de ensayo, así como menos muertes de animales de ensayo durante la aplicación *in vivo*) en comparación con la aplicación de los dos anticuerpos mono-específicos individuales correspondientes contra VEGF y ANG-2 en combinación.

25 Además, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente invención pueden proporcionar beneficios tales como una dosis y/o frecuencia de administración reducida y de forma concomitante un ahorro de costes.

30 El término "región constante" tal como se utiliza en las aplicaciones actuales indica la suma de los dominios de un anticuerpo distintos a los de la región variable. La región constante no está directamente involucrada en la unión de un antígeno, pero exhibe diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse además en subclases, como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de la cadena ligera que se pueden encontrar en las cinco clases de anticuerpos se denominan κ (kappa) y λ (lambda).

35 El término "región constante derivada de origen humano" tal como se utiliza en la presente aplicación denota una región constante de cadena pesada de un anticuerpo humano de subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región constante de la cadena ligera kappa o lambda. Tales regiones constantes son bien conocidas en la materia y por ejemplo se describen en Kabat, EA, (ver por ejemplo, Johnson, G., y Wu, TT, Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, EA, et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 72 (1975) 2785-2788).

40 Mientras los anticuerpos de la subclase IgG4 muestran una unión reducida al receptor Fc (Fc γ RIIIA), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una fuerte unión. Sin embargo Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidratos del Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435 son residuos que, si se alteran, proporcionan también una unión reducida al receptor (Shields, RL, et al, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591 a 6604; Lund, J., et al, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al, Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434).

45 En una realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una unión reducida a FcR comparado con un anticuerpo IgG1 y el anticuerpo parental mono-específico bivalente (completo) es respecto a la unión de FcR de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una realización, las mutaciones en el anticuerpo parental bivalente mono-específico (completo) son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236. En otra realización, las mutaciones en el anticuerpo parental bivalente mono-específico (completo) están en S228P de IgG4 y en L234A y L235A de IgG1. Las regiones constantes de la cadena pesada se muestran en el Id. de Sec N°: 35 y 36. En una realización, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo parental bivalente mono-específico (completo) es la de la Id. de Sec N°: 35 con las mutaciones L234A y L235A. En otra realización, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo parental bivalente mono-específico (completo) es la de Id. de Sec N°: 36 con la mutación S228P. En otra realización, la región constante de la cadena ligera del anticuerpo parental bivalente mono-específico (completo) es una región de la cadena ligera kappa de Id. de Sec N°: 37 o una región de la cadena ligera lambda de Id. de Sec N°: 34.

Preferiblemente, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo parental bivalente mono-específico (completo) es la de Id. de Sec N°: 35 o la Id. de Sec N°: 36 con la mutación S228P .

La región constante de un anticuerpo está directamente implicada en la CCDA (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). La activación del complemento (CDC) se inicia por la unión del factor del complemento C1q a la región constante de la mayoría de las subclases de anticuerpos de IgG. La unión de C1q a un anticuerpo es causada por interacciones definidas proteína-proteína en el denominado sitio de unión. Tales sitios de unión de la región constante son conocidos en la materia y se describen por ejemplo, e Lukas, T. J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. y Cebra, JJ, *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, DR, et al, *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, JE, et al, *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, EE, et al, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al, *J. Virol.* 75 (2001) 12.161-12.168; Morgan, A., et al, *Immunology* 86 (1995) 319-324, y la EP 0 307 434. Tales sitios de unión de la región constante se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice UE de Kabat).

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA)" se refiere a la lisis de células diana humanas por un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de células efectoras. La CCDA se mide preferiblemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan CCR5 con un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de células efectoras tales como CMSP recién aisladas o células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias, como monocitos o células asesinas naturales (NK) o una línea celular NK en crecimiento permanente.

El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" denota un proceso iniciado por la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo es causada por interacciones definidas proteína-proteína en el llamado sitio de unión. Tales sitios de unión a la parte Fc son conocidos en la materia (véase más arriba). Tales sitios de unión a la parte Fc, por ejemplo, se caracterizan por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con índice UE de Kabat). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 y IgG3 por lo general muestran activación del complemento, incluyendo la unión a C1q y C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une a C1q y/o C3 .

El anticuerpo de acuerdo con la invención se produce por métodos recombinantes. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención y un aspecto adicional es una célula que comprende dicho ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención. Los métodos para la producción recombinante son ampliamente conocidos en la materia y comprenden la expresión de proteínas en células procariontas y eucariotas con el posterior aislamiento del anticuerpo y a menudo la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos como se ha mencionado anteriormente en una célula huésped, los ácidos nucleicos que codifican las respectivas cadenas pesadas y ligeras modificadas se insertan en vectores de expresión por métodos estándar. La expresión se realizó en células huésped procariontas o eucariotas apropiadas, como las células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levadura o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recuperó a partir de las células (sobrenadante o células después de la lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, SC, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R. J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

Los anticuerpos biespecíficos se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, la proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El DNA y RNA que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como una fuente de tal DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA puede insertarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma, que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes (o mutantes) de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico se preparan introduciendo los cambios de nucleótido apropiados en el DNA del anticuerpo o mediante síntesis de nucleótidos. Tales modificaciones se pueden realizar, sin embargo, sólo en un rango muy limitado, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alterarán las características de los anticuerpos mencionadas anteriormente, tales como el isotipo de IgG y la unión al antígeno, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción, la estabilidad de la proteína recombinante o facilitar la purificación.

El término "célula huésped" como se usa en la aplicación actual se refiere a cualquier tipo de sistema celular que puede ser diseñado para generar los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En una forma de realización las células HEK293 y células CHO se utilizan como células huésped. Como se utilizan aquí, las expresiones "célula",

- "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeta primaria y los cultivos derivados de esta sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entenderá que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en su contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que la detectada en la célula originalmente transformada.
- La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, en Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. El clonaje de los dominios variables se describe en Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; and Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferible (HEK 293) se describe en Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 y en Schlaeger, E.-J., in *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.
- Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Es conocido que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.
- Un ácido nucleico está "unido de forma operativa" cuando se sitúa en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una pre-secuencia o líder de secreción está unido de forma operativa al DNA de un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de forma operativa a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido de forma operativa a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilita la traducción. Generalmente, "unido de forma operativa" significa que las secuencias de DNA que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en los sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o enlazantes de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.
- La purificación de anticuerpos se lleva a cabo con el fin de eliminar los componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante las técnicas estándar, incluyendo el tratamiento alcalino/ SDS, bandas en CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la materia. Véase Ausubel, F., et al., Ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987). Diferentes métodos están bien establecidos y se utilizan de forma generalizada para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad a proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), de intercambio de aniones (resinas de aminoetilo) y de intercambio mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), de interacción hidrofóbica o cromatografía de adsorción aromática (por ejemplo, con fenilsefarsa, resinas azarenofílicas, o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad a quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad Ni (II) y Cu (II)), cromatografía de exclusión por tamaño y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, MA, *Appl Biochem Biotech* 75 (1998) 93-102).
- Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención. Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de una composición farmacéutica. Un aspecto adicional de la invención es un método para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, formulado junto con un vehículo farmacéutico.
- Una realización de la invención es el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para el tratamiento del cáncer.
- Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.
- Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- Otro aspecto de la invención es el método de tratamiento de paciente que sufre de cáncer mediante la administración de un anticuerpo de acuerdo con la invención al paciente en necesidad de tal tratamiento.
- Tal como se utiliza aquí, "vehículo farmacéutico" incluye cualquiera de todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares,

que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión).

5 Una composición de la presente invención se puede administrar a través de una variedad de métodos conocidos en la materia. Como el experto en la materia apreciará, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención por ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes aceptables a nivel farmacéutico incluyen las soluciones salinas y tampones acuosos. Los 10 vehículos farmacéuticos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y los polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia.

15 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se utilizan aquí, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, y la infusión epidural y intraesternal.

20 El término cáncer tal como se utiliza aquí se refiere a enfermedades proliferativa como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM), cáncer de pulmón de células bronquioalveolar, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de los tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, 30 neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, Schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma de la pituitaria y sarcoma de Ewing, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

35 Otro aspecto de la invención es el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención o dicha composición farmacéutica como agente antiangiogénico. Tal agente antiangiogénico se puede utilizar para el tratamiento del cáncer, especialmente los tumores sólidos y otras enfermedades vasculares.

40 Una realización de la invención es el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para el tratamiento de enfermedades vasculares.

Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica para el tratamiento de las enfermedades vasculares.

45 Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades vasculares.

Otro aspecto de la invención es el método de tratamiento de un paciente que sufre de enfermedades vasculares mediante la administración de un anticuerpo de acuerdo con la invención a un paciente en necesidad de tal 50 tratamiento.

El término "enfermedades vasculares" incluye cáncer, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis, isquemia, trauma, sepsis, EPOC, asma, diabetes, AMD, retinopatía, accidente cerebrovascular, adipositas, lesión pulmonar aguda, hemorragia, fugas vasculares por ejemplo la inducida por citoquinas, alergia, enfermedad de Graves, tiroiditis autoinmune de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, arteritis de células gigantes, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, colitis ulcerosa, especialmente los tumores sólidos, síndromes de neovascularización intraocular tales como las retinopatías proliferativas o la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la artritis reumatoide y la psoriasis (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10.931 a 10.934; Klagsbrun, M., et al, Annu Rev. Physiol 53 (1991) 217-239; y Garner, A., Vascular diseases, en: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., y Klintworth, GK, (Ed.), 2ª edición, Marcel Dekker, Nueva York (1994), págs. 1625-1710). 60

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Se puede asegurar la ausencia de la presencia de microorganismos tanto mediante procedimientos de esterilización, supra, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y 65

antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, están formuladas en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante los métodos convencionales conocidos los expertos en la materia.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una serie de factores farmacocinéticos, que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que está siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en la práctica médica.

La composición debe ser estéril y fluida de manera que la composición pueda liberarse mediante una jeringa. Además de agua, el transportador preferentemente es una solución salina tamponada isotónica.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como el manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición.

Como se utiliza aquí, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y cultivos derivados de las mismas sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que la observada en la célula originalmente transformada. Cuando se pretendan designaciones diferentes, quedará claro a partir del contexto.

El término "transformación" como se usa aquí, se refiere al proceso de transferencia de un vector/ ácido nucleico a una célula huésped. Si se utilizan células sin paredes celulares formidables como células huésped, la transfección se lleva a cabo por ejemplo, por el método de precipitación con fosfato de calcio como se describe en Graham, FL, van der Eb, AJ, Virology 52 (1978) 546ff. Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos para introducir DNA en las células, tales como la inyección nuclear o mediante fusión de protoplastos. Si se utilizan células procariontas o células que contienen construcciones de pared celular sustanciales, por ejemplo, un método de transfección es el tratamiento con calcio, utilizando cloruro de calcio como se describe en Cohen, SN, et al., PNAS 69 (1972) 2110-2114.

Como se usa aquí, "expresión" se refiere al proceso por el cual un ácido nucleico que se transcribe en RNAm y/o para el proceso por el cual el RNAm transcrito (también denominado transcrito) posteriormente se traduce en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente producto génico. Si el polinucleótido se deriva de DNA genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir un corte y empalme del RNAm. Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular autoreplicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células huésped. El término incluye los vectores que funcionan principalmente para la inserción de DNA o RNA en una célula (por ejemplo, la integración cromosómica), la replicación de los vectores que funcionan principalmente para la replicación de DNA o RNA, y los vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción de DNA o RNA. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones descritas.

Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula huésped apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un "sistema de expresión" generalmente se refiere a una célula huésped adecuada compuesta por un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

Descripción de las secuencias de aminoácido

Id. de Sec. Nº:	1	CDR3 de la cadena pesada, <VEGF>bevacizumab
Id. de Sec. Nº:	2	CDR2 de la cadena pesada, <VEGF>bevacizumab

ES 2 455 217 T3

Id. de Sec. Nº:	3	CDR1 de la cadena pesada, <VEGF>bevacizumab
Id. de Sec. Nº:	4	CDR3 de la cadena ligera, <VEGF>bevacizumab
Id. de Sec. Nº:	5	CDR2 de la cadena ligera, <VEGF>bevacizumab
Id. de Sec. Nº:	6	CDR1 de la cadena ligera, <VEGF>bevacizumab
Id. de Sec. Nº:	7	dominio variable de la cadena pesada, <VEGF>bevacizumab
Id. de Sec. Nº:	8	dominio variable de la cadena ligera, <VEGF>bevacizumab
Id. de Sec. Nº:	9	CDR3 de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab
Id. de Sec. Nº:	10	CDR2 de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab
Id. de Sec. Nº:	11	CDR1 de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab
Id. de Sec. Nº:	12	CDR3 de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab
Id. de Sec. Nº:	13	CDR2 de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab
Id. de Sec. Nº:	14	CDR1 de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab
Id. de Sec. Nº:	15	dominio variable de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab
Id. de Sec. Nº:	16	dominio variable de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab
Id. de Sec. Nº:	17	CDR3 de la cadena pesada, <VEGF>HuMab G6-31
Id. de Sec. Nº:	18	CDR2 de la cadena pesada, <VEGF> HuMab G6-31
Id. de Sec. Nº:	19	CDR1 de la cadena pesada, <VEGF> HuMab G6-31
Id. de Sec. Nº:	20	CDR3 de la cadena ligera, <VEGF> HuMab G6-31
Id. de Sec. Nº:	21	CDR2 de la cadena ligera, <VEGF> HuMab G6-31
Id. de Sec. Nº:	22	CDR1 de la cadena ligera, <VEGF> HuMab G6-31
Id. de Sec. Nº:	23	dominio variable de la cadena pesada, <VEGF> HuMab G6-31
Id. de Sec. Nº:	24	dominio variable de la cadena ligera, <VEGF> HuMab G6-31
Id. de Sec. Nº:	25	CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Mab 536
Id. de Sec. Nº:	26	CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Mab 536
Id. de Sec. Nº:	27	CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Mab 536
Id. de Sec. Nº:	28	CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Mab 536
Id. de Sec. Nº:	29	CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Mab 536
Id. de Sec. Nº:	30	CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Mab 536
Id. de Sec. Nº:	31	dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Mab 536
Id. de Sec. Nº:	32	dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Mab 536
Id. de Sec. Nº:	33	Enlazante (G4S) ₄
Id. de Sec. Nº:	34	región constante de la cadena ligera lambda
Id. de Sec. Nº:	35	región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG1
Id. de Sec. Nº:	36	región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG4
Id. de Sec. Nº:	37	región constante de la cadena ligera kappa
Id. de Sec. Nº:	38	CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
Id. de Sec. Nº:	39	CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
Id. de Sec. Nº:	40	CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
Id. de Sec. Nº:	41	CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
Id. de Sec. Nº:	42	CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
Id. de Sec. Nº:	43	CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
Id. de Sec. Nº:	44	dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
Id. de Sec. Nº:	45	dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
Id. de Sec. Nº:	46	CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06
Id. de Sec. Nº:	47	CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC06
Id. de Sec. Nº:	48	CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06
Id. de Sec. Nº:	49	CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06
Id. de Sec. Nº:	50	CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06
Id. de Sec. Nº:	51	CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06
Id. de Sec. Nº:	52	dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06
Id. de Sec. Nº:	53	dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06
Id. de Sec. Nº:	54	CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
Id. de Sec. Nº:	55	CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
Id. de Sec. Nº:	56	CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
Id. de Sec. Nº:	57	CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07
Id. de Sec. Nº:	58	CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07
Id. de Sec. Nº:	59	CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07
Id. de Sec. Nº:	60	dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
Id. de Sec. Nº:	61	dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07
Id. de Sec. Nº:	62	CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08
Id. de Sec. Nº:	63	CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC08
Id. de Sec. Nº:	64	CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC08

ES 2 455 217 T3

Id. de Sec. Nº:	65	CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC08
Id. de Sec. Nº:	66	CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC08
Id. de Sec. Nº:	67	CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC08
Id. de Sec. Nº:	68	dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC08
Id. de Sec. Nº:	69	dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC08
Id. de Sec. Nº:	70	CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
Id. de Sec. Nº:	71	CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
Id. de Sec. Nº:	72	CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
Id. de Sec. Nº:	73	CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09
Id. de Sec. Nº:	74	CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09
Id. de Sec. Nº:	75	CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09
Id. de Sec. Nº:	76	dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
Id. de Sec. Nº:	77	dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09
Id. de Sec. Nº:	78	CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10
Id. de Sec. Nº:	79	CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10
Id. de Sec. Nº:	80	CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10
Id. de Sec. Nº:	81	CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10
Id. de Sec. Nº:	82	CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10
Id. de Sec. Nº:	83	CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10
Id. de Sec. Nº:	84	dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10
Id. de Sec. Nº:	85	dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10
Id. de Sec. Nº:	86	CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
Id. de Sec. Nº:	87	CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
Id. de Sec. Nº:	88	CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
Id. de Sec. Nº:	89	CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11
Id. de Sec. Nº:	90	CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11
Id. de Sec. Nº:	91	CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11
Id. de Sec. Nº:	92	dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
Id. de Sec. Nº:	93	dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11
Id. de Sec. Nº:	94	CDR3 de la cadena pesada, <VEGF>B20-4.1
Id. de Sec. Nº:	95	CDR2 de la cadena pesada, <VEGF>B20-4.1
Id. de Sec. Nº:	96	CDR1 de la cadena pesada, <VEGF>B20-4.1
Id. de Sec. Nº:	97	CDR3 de la cadena ligera, <VEGF>B20-4.1
Id. de Sec. Nº:	98	CDR2 de la cadena ligera, <VEGF>B20-4.1
Id. de Sec. Nº:	99	CDR1 de la cadena ligera, <VEGF>B20-4.1
Id. de Sec. Nº:	100	dominio variable de la cadena pesada, <VEGF>B20-4.1
Id. de Sec. Nº:	101	dominio variable de la cadena ligera, <VEGF>B20-4.1
Id. de Sec. Nº:	102	péptido de fusión de la cadena pesada de bevacizumab Ang2i_LC06 scFv, <VEGF-ANG-2> TvAb-2441- bevacizumab-LC06
Id. de Sec. Nº:	103	péptido de fusión de la cadena pesada de bevacizumab Ang2i_LC08 scFv <VEGF-ANG-2> TvAb-2441- bevacizumab-LC08
Id. de Sec. Nº:	104	cadena ligera de bevacizumab
Id. de Sec. Nº:	105	Factor de crecimiento vascular endotelial humano (VEGF)
Id. de Sec. Nº:	106	Angiopoyetina-2 humana (ANG-2)
Id. de Sec. Nº:	107	Angiopoyetina-1 (ANG-1)
Id. de Sec. Nº:	108	Receptor Tie-2 humano
Id. de Sec. Nº:	109	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, tetravalente de cadena sencilla Fab <VEGF-ANG-2> scFAB-Avastin-LC06-2620
Id. de Sec. Nº:	110	Cadena ligera de la molécula de anticuerpo biespecífico, tetravalente de cadena sencilla Fab <VEGF-ANG-2> scFAB-Avastin-LC06-2620
Id. de Sec. Nº:	111	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, tetravalente de cadena sencilla Fab <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640
Id. de Sec. Nº:	112	Cadena ligera de la molécula de anticuerpo biespecífico, tetravalente de cadena sencilla Fab <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640
Id. de Sec. Nº:	113	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, tetravalente de cadena sencilla Fab <VEGF-ANG-2> scFAB-Avastin-Ang2i-LC06-2641
Id. de Sec. Nº:	114	Cadena ligera de la molécula de anticuerpo biespecífico, tetravalente de cadena sencilla Fab <VEGF-ANG-2> scFAB-Avastin-Ang2i-LC06-2641
Id. de Sec. Nº:	115	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, trivalente de cadena sencilla Fab <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-KiH-C-scFab
Id. de Sec. Nº:	116	Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo biespecífico, trivalente de cadena sencilla Fab <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-KiH-C-scFab
Id. de Sec. Nº:	117	Cadena ligera de la molécula de anticuerpo biespecífico, trivalente de cadena

		sencilla Fab <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-KiH-C-scFab
Id. de Sec. Nº:	118	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, trivalente <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CFab- 6CSS
Id. de Sec. Nº:	119	Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo biespecífico, trivalente <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CFab- 6CSS
Id. de Sec. Nº:	120	Cadena ligera de la molécula de anticuerpo biespecífico, trivalente <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-C-Fab- 6CSS
Id. de Sec. Nº:	121	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL
Id. de Sec. Nº:	122	Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL
Id. de Sec. Nº:	123	Cadena ligera 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL
Id. de Sec. Nº:	124	Cadena ligera 2 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL
Id. de Sec. Nº:	125	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL
Id. de Sec. Nº:	126	Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL
Id. de Sec. Nº:	127	Cadena ligera 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06- VH-VL
Id. de Sec. Nº:	128	Cadena ligera 2 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06- VH-VL
Id. de Sec. Nº:	129	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL-SS
Id. de Sec. Nº:	130	Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL-SS
Id. de Sec. Nº:	131	Cadena ligera 1 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06- VH-VL-SS
Id. de Sec. Nº:	132	Cadena ligera 2 de la molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente con intercambio de dominios <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06- VH-VL-SS
Id. de Sec. Nº:	133	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc biespecífico, bivalente <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-N-scFab
Id. de Sec. Nº:	134	Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc biespecífico, bivalente <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-N-scFab
Id. de Sec. Nº:	135	Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc biespecífico, bivalente <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-N-scFabSS
Id. de Sec. Nº:	136	Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc biespecífico, bivalente <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-N-scFabSS

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar en la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entenderá que se pueden hacer modificaciones en los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

5

Descripción de las figuras

Figura 1A. Estructura esquemática de una realización tetravalente de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, con unión a VEGF y ANG-2, en el que uno de los antígenos A o B es el VEGF, mientras que el otro es ANG-2. La estructura se basa en un anticuerpo de longitud completa de unión al antígeno A, al que se han unido dos Fv de cadena sencilla (opcionalmente estabilizados con disulfuro) de unión al antígeno B, a través de un péptido enlazante.

10

Figura 1B Representación esquemática de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos generados utilizando la nomenclatura TvAb (véanse los Ejemplos) - ya sea sin o con estabilización con disulfuros de la scFv.

15

Figura 2A Representación esquemática de anticuerpo tetravalente biespecífico <VEGF-ANG-2> estabilizado con disulfuro (= <VEGF-ANG-2> TvAb6; N ° 2331, véase la Tabla 3)

Figura 2B Mapas del plásmido de la cadena pesada y ligera modificada y los vectores utilizados para la expresión del <VEGF-ANG-2> TvAb6 estabilizado con disulfuro.

20

Figura 3 SDS-PAGE del <VEGF-ANG-2> TvAb6 purificado y estabilizado con disulfuro en comparación con el anticuerpo IgG1 humano "estándar" G6-31 (<VEGF> HuMab G6-31) en condiciones reductoras y no reductoras

25

Figura 4 Cromatografía de exclusión de tamaño del <VEGF-ANG-2> TvAb6 purificado y estabilizado con disulfuro en comparación con el anticuerpo IgG1 humano "estándar" G6-31 muestra que el TvAb6 estabilizado con disulfuro no forma de nuevo agregados tras la purificación.

5 Figura 5 Vista esquemática y resultados de un ELISA de unión a VEGF. El <VEGF-ANG-2> TvAb6 estabilizado con disulfuro se une al VEGF de forma comparable a <VEGF> G6-31. El <ANG-2> Mab536 no se une al VEGF.

Figura 6A Vista esquemática y resultados de de un ELISA de unión a ANG-2. El <VEGF-ANG-2> TvAb6 estabilizado con disulfuro se une a ANG-2 de forma comparable a <ANG-2> Mab536. El <VEGF> G6-31 no se une a ANG-2.

10 Figura 6B Vista esquemática y resultados del análisis de unión a ANG-2 por resonancia de plasmón superficial (Biacore). El <VEGF-ANG-2> TvAb6 estabilizado con disulfuro se une a ANG-2 con una afinidad comparable al <ANG-2> Mab536.

15 Figura 7 Vista esquemática y resultados del ELISA de puente VEGF-ANG-2. El <VEGF-ANG- 2> TvAb6 estabilizado con disulfuro se une simultáneamente a VEGF y ANG-2, mientras que <VEGF> G6-31 y <ANG-2> Mab536 no son capaces de unirse simultáneamente a VEGF y ANG-2.

20 Figura 8a Eficacia del <VEGF-ANG-2> TvAb6 estabilizado con disulfuro en comparación con el <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 y la combinación de Mab536 y G6-31 en el modelo de xenoinjerto subcutáneo por estadios Colo205 en ratones SCID color beige (estudio ANG2_Pz_Colo205_003).

25 Figura 8b Eficacia del <VEGF-ANG-2> TvAb6 estabilizado con disulfuro en comparación con el <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 y la combinación de Mab536 y G6-31 en el modelo de xenoinjerto subcutáneo por estadios Colo205 en ratones SCID beige (estudio ANG2_Pz_Colo205_005).

Figura 9 Resultados del bloqueo de la formación del tubo inducida por VEGF, por el anticuerpo tetravalente biespecífico <VEGF-ANG-2> TvAb6.

30 Figura 10 A + B Análisis cuantitativo del bloqueo de la formación del tubo inducida por VEGF por el <VEGF-ANG-2> TvAb6 estabilizado con disulfuro.

Figura 11 Vista esquemática del análisis de unión a VEGF por resonancia del plasmon en superficie (Biacore).

35 Figura 12 Características cinéticas de los dos anticuerpos <VEGF> <VEGF-Ang-2> TvAb6 y <VEGF> G6-31 en una gráfica Ka-Kd.

Figura 13 Vista esquemática del ensayo de resonancia del plasmón superficial (Biacore) para detectar la unión simultánea de ANGPT2 y VEGF a los anticuerpos biespecíficos.

40 Figura 14 Resultados de los experimentos de resonancia de plasmón superficial (Biacore) que muestran que TvAb6 se une simultáneamente a ANGPT2 y VEGF.

45 Figura 15A+B. A) Representación esquemática del ensayo simultáneo y biespecífico de unión Biacore de los anticuerpos biespecíficos <VEGFANG-2>. B) Datos de Biacore que demuestran la unión simultánea de ANG-2 y VEGF a TvAb-2441-bevacizumab_LC06.

50 Figura 16 A+B. Fosforilación de Tie2 por los anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y <VEGF-ANG-2> TvAb-2441, en comparación con los anticuerpos anti-ANG2 <ANG-2> Ang2i_LC06 y <ANG-2> Ang2k_LC08

Figura 17 Representación esquemática del ELISA de interacción de la angiopoyetina humana

55 Figura 18 Proliferación de HUVEC inducida por VEGF del <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y <VEGFANG- 2> TvAb-2441-bevacizumab-LC08 y bevacizumab.

60 Figura 19 Eficacia anti-angiogénica in vivo del anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2> bevacizumab-LC06 en comparación con <ANG-2> ANG2i-LC06, y la combinación de <ANG-2> ANG2i-LC06 y Avastin (bevacizumab) en el modelo de xenotrasplante Calu3 controlado mediante un anticuerpo anti-CD31 marcado y el cambio relativo de la señal de CD31 durante la terapia.

Procedimiento experimental

Ejemplos

65

Materiales y métodos generales

- 5 Información general acerca de las secuencias de nucleótidos de las inmunoglobulinas humanas cadenas ligeras y pesadas se proporciona en: Kabat, EA, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de cadenas de anticuerpo están numeradas y se denominan de acuerdo con la numeración de la UE (Edelman, GM, et al, Proc Natl Acad Sci USA 63 (1969) 78-85; Kabat, EA, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).
- 10 Técnicas de DNA recombinante
- Los métodos estándar se utilizaron para manipular el DNA como se describe en Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se emplearon de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 15 Síntesis génica
- Se prepararon segmentos del gen deseado a partir de oligonucleótidos hechos por síntesis química. Los segmentos de genes, que están flanqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción únicos, fueron ensamblados por reasociación y ligación de los oligonucleótidos, incluyendo amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron a través de los sitios de restricción indicados por ejemplo, KpnI/SacI o AscI/PacI en un vector de clonación pGA4 basado en pPCRScrip (Stratagene). Las secuencias de DNA de los fragmentos de genes subclonados se confirmaron por secuenciación de DNA. Los fragmentos de síntesis génica se ordenan de acuerdo con las especificaciones proporcionadas por Geneart (Regensburg, Alemania). Todos los segmentos génicos que codifican cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos biespecíficos Ang-2/VEGF se sintetizaron con una secuencia de DNA en el extremo 5' que codifica para un péptido líder (MGWSCILFLVATATGVHS), que dirige a las proteínas a su secreción en las células eucariotas, y las dianas de restricción 5'-BamHI y 3'-XbaI. Las secuencias de DNA que llevan cadenas pesadas, modificado con la estrategia de botón en ojal ("knobs in hole"), estabilizadas con disulfuro fueron diseñadas con las mutaciones S354C y T366W en el "botón" de la pesada cadena y las mutaciones Y349C, T366S, L368A y Y407V en el "ojal" de la cadena pesada.
- 30 Determinación de la secuencia de DNA
- Las secuencias de DNA se determinaron mediante una secuenciación de doble cadena realizada en Medigenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemania).
- 35 Análisis de las secuencias de DNA y proteínas y gestión de datos de la secuencia
- El paquete de software del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) versión 10.2 y el Vector NT1 Avance Suite de Infomax versión 8.0 se utilizaron para la creación de la secuencia, el mapado, análisis, anotación e ilustración.
- 40 Vectores de expresión (para el ejemplo 1) (referencia)
- 45 Para la expresión de las variantes de anticuerpos descritas se utilizaron plásmidos de expresión para la expresión transitoria en células (por ejemplo, en células HEK293 EBNA o HEK293-F) o para la expresión estable (por ejemplo, en células CHO) basados en una organización de DNAC con un intrón A del promotor de CMV o en una organización genómica con un promotor de CMV (por ejemplo, la Figura 2B).
- 50 Al lado de la casete de expresión de anticuerpos los vectores contenían:
- un origen de replicación que permite la replicación de este plásmido en E. coli , y
 - un gen beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en E. coli.
- 55 La unidad de transcripción del gen del anticuerpo se compone de los siguientes elementos:
- sitio(s) de restricción único(s) en el extremo 5',
 - el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano,
 - seguido por la secuencia del intrón A en el caso de la organización de DNAC,
 - una región 5' no traducida de un gen de anticuerpo humano,
 - una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina,
 - la cadena de anticuerpo humano (cadena pesada, pesada cadena modificada o cadena ligera), ya sea como DNAC o como organización genómica con la organización exón-intrón de la inmunoglobulina
 - una región 3' no traducida con una secuencia señal de poliadenilación, y
 - sitio(s) de restricción único(s) en el extremo 3'.
- 60

Los genes de fusión que comprenden las secuencias de la cadena pesada del anticuerpo seleccionado y la fusión scFv C-terminal como se describe a continuación se generaron mediante PCR y/o síntesis génica y se ensamblaron con métodos y técnicas recombinantes conocidas mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico adecuados, por ejemplo, usando sitios únicos NsiI y EcoRI en los vectores de la cadena pesada genómica. Las secuencias de ácidos nucleicos subclonados fueron verificados por secuenciación del DNA. Para las transfecciones transitorias y estables se prepararon cantidades mayores de los plásmidos mediante la preparación de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformadas (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Vectores de expresión (por ejemplo 10-14)

Se utilizó un vector de expresión que consta de los siguientes elementos:

- un gen de resistencia a higromicina como marcador de selección,
- un origen de replicación, oriP, del virus de Epstein-Barr (EBV),
- un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*
- un gen beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*,
- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (HCMV),
- la secuencia señal de poliadenilación ("poli A") de la inmunoglobulina 1 humana y
- sitios de restricción únicos BamHI y XbaI.

Los genes de fusión de inmunoglobulina que comprenden las construcciones de la cadena ligera o pesada, así como las construcciones de botón en ojal con los dominios VH y VL C-terminales se prepararon mediante síntesis génica y se clonaron en plásmidos pGA 18 (amp^r) como se describe. Los plásmidos PG18 (amp^r) que llevan los segmentos de DNA sintetizados y el vector de expresión de Roche se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y XbaI (Roche Molecular Biochemicals) y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Los segmentos de DNA que codifican la cadena pesada y ligera purificados se ligaron luego al fragmento aislado BamHI/ XbaI del vector de expresión Roche resultante de los vectores de expresión finales. Los vectores de expresión finales se transformaron en células de *E. coli*, se aisló el DNA plasmídico de expresión (Miniprep) y se sometió a un análisis con enzimas de restricción y secuenciación de DNA. Los clones correctos se cultivaron en 150 ml de medio LB-Amp, y de nuevo se aisló el DNA del plásmido (maxiprep) y la integridad de la secuencia se confirmó mediante secuenciación del DNA.

Técnicas de cultivo celular

Se utilizaron técnicas de cultivo celular estándar como se describen en *Current Protocols in Cell Biology* (2000), Bonifacino, JS, Dasso, M., Harford, JB, Lippincott - Schwartz, J. y Yamada, KM (Eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F (para el ejemplo 1) (referencia)

Los anticuerpos se generaron mediante transfección transitoria de los dos plásmidos que codifican la cadena pesada o cadena pesada modificada, respectivamente, y la correspondiente cadena ligera usando el sistema HEK293-C (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células HEK293-F (Invitrogen) creciendo en suspensión ya sea en un matraz de agitación o en un fermentador de agitación en medio de expresión FreeStyle 293 exento de suero medio (Invitrogen) fueron transfectadas con una mezcla de los dos respectivos plásmidos de expresión y 293fectina o fectina (Invitrogen). Por ejemplo, en un matraz de 2 L en agitación (Coming) se sembraron células HEK293-F a una densidad de 1,0 E*6 células/ml en 600 ml y se incubó a 120 rpm, al 8% de CO₂. El día después de que las células se transfectaron a una densidad celular de alrededor de 1,5E*6 células/ ml con alrededor de 42 ml de la mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 µg de DNA plasmídico total (1 µg/ ml) que codifica la cadena pesada o pesada modificada, respectivamente, y la correspondiente cadena ligera en una relación equimolar y B) 20 ml de Opti-MEM + 1,2 ml 293fectina o fectina (2 µl/ ml). De acuerdo con el consumo de glucosa se añadió solución de glucosa durante el curso de la fermentación. El sobrenadante que contenía el anticuerpo secretado se recogió después de 5-10 días y los anticuerpos fueron purificados directamente a partir del sobrenadante o el sobrenadante fue congelado y almacenado.

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F (para el ejemplo 10-14)

Variantes de las inmunoglobulinas recombinantes se expresaron mediante transfección transitoria de células renales 293-F de embriones humanos utilizando el sistema de expresión FreeStyle™ 293 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, EE.UU.). Brevemente, las células 293-F FreeStyle™ en suspensión se cultivaron en medio de expresión FreeStyle™ 293 a 37°C/ 8 % de CO₂ y las células se sembraron en medio fresco a una densidad de 1-2 x 10⁶ células viables/ ml en el día de la transfección. Complejos de DNA-293fectin™ se prepararon en medio Opti-MEM ® I (Invitrogen, EE.UU.), utilizando 325 µl de 293fectina™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg de plásmido de DNA de la cadena ligera y pesada en una relación molar de 1:1 para un volumen final de la transfección de 250 ml. Los complejos de DNA-293fectina con "botón en ojal" con dos cadenas pesadas y una cadena ligera se prepararon en medio Opti-MEM ® I (Invitrogen, EE.UU.), utilizando 325 µl de 293fectina™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg de DNA plasmídico de la cadena pesada 1 y 2 con "botón en ojal" y la cadena ligera en una relación molar 1:1:2 para un volumen final de 250 ml de transfección. Los complejos de DNA-293fectina con "botón en ojal" con dos cadenas

pesadas se prepararon en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, EE.UU.), utilizando 325 µl de 293fectina™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg de DNA de la cadena pesada 1 y 2 con "botón en ojal" en una relación molar de 1:1 para un volumen final de transfección de 250 µl. Los complejos de DNA del CrossMab 293fectina se prepararon en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, EE.UU.), utilizando 325 µl de 293fectina™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg de DNA plasmídico de la cadena pesada 1 y 2 con "botón en ojal" y de la cadena ligera en una relación molar de 1:1:1:1 para un volumen final de transfección de 250 µl. Los sobrenadantes de cultivo celular que contienen anticuerpo se recogieron 7 días después de la transfección por centrifugación a 14000 g durante 30 minutos y se filtraron a través de un filtro estéril (0,22 µm). Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta la purificación.

10 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de los anticuerpos y derivados purificados se determinó mediante la determinación de la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

15 Determinación de la concentración de anticuerpo en sobrenadantes

La concentración de anticuerpos y derivados en los sobrenadantes de cultivo celular se estimó mediante inmunoprecipitación con cuentas de proteína A agarosa (Roche). 60 µl de cuentas de proteína A agarosa se lavaron tres veces en TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% de Nonidet-P40). Posteriormente, 1-15 ml de sobrenadante de cultivo celular se aplicaron a las cuentas de proteína A agarosa preequilibradas en TBS-NP40. Después de la incubación durante al 1 h a temperatura ambiente, las perlas se lavaron en una columna filtro de Ultrafree-MC (Amicon) una vez con 0,5 ml de TBS-NP40, dos veces con 0,5 ml de tampón fosfato salino 2x (2 x PBS, Roche) y brevemente cuatro veces con 0,5 ml de Na-citrato 100 mM a pH 5,0. El anticuerpo unido se eluyó por adición de 35 µl de tampón de muestra LDS (Invitrogen) de NuPAGE®. La mitad de la muestra se combinó con agente reductor de muestras NuPAGE® o se dejó no reducido, respectivamente, y se calentó durante 10 min. a 70°C. En consecuencia, se aplicaron 20 µl a un SDS-PAGE Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen)® del 4-12% (con tampón MOPS para la SDS-PAGE no reducido y tampón MES con aditivo del tampón de electroforesis antioxidante NuPAGE® (Invitrogen) para la SDS-PAGE reductiva) y se tiñeron con azul de Coomassie .

La concentración de anticuerpos y derivados en los sobrenadantes de cultivo celular se midió mediante cromatografía HPLC en Proteína A. Brevemente, los sobrenadantes de cultivo celular que contienen anticuerpos y derivados que se unen a la proteína A se aplicaron a una columna de proteína A HiTrap (GE Healthcare) en K₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,3 y se eluyó de la matriz con ácido acético 550 mM, pH 2,5 en un sistema de HPLC-Dionex. La proteína eluida se cuantificó por absorbancia UV y la integración de áreas de los picos. Un anticuerpo IgG1 estándar purificado sirvió como estándar.

Alternativamente, la concentración de anticuerpos y derivados en los sobrenadantes de cultivo celular se midió mediante sandwich-IgG-ELISA. Brevemente, las placas microtituladas de 96 pocillos con estreptavidina A StreptaWell High Bind (Roche) se recubrieron con 100 µl/ pocillo de una molécula de captura de IgG anti-humano biotilada F(ab')₂ <hFcgamma> BI (Dianova) a 0,1 µg/ ml durante 1 h a temperatura ambiente o, alternativamente, durante la noche a 4°C y posteriormente se lavaron tres veces con 200 µl/ pocillo de PBS, 0,05% de Tween (PBST, Sigma). Se añadieron 100 µl/ pocillo de una serie de diluciones en PBS (Sigma) del respectivo anticuerpo que contiene sobrenadantes de cultivo celular a los pocillos y se incubaron durante 1-2 h en un agitador de placas microtituladas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl/ pocillo de PBST y el anticuerpo unido se detectó con 100 µl de F(ab')₂ <hFcgamma> POD (Dianova) a 0,1 µg/ ml como anticuerpo de detección durante 1-2 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se eliminó por lavado tres veces con 200 µl/ pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 µl de ABTS/ pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

Purificación de proteínas

Las proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrado que hacen referencia a protocolos estándar. En breve, los anticuerpos se aplicaron a una columna de Proteína A-Sepharose (GE Healthcare) y se lavaron con PBS. La elución de los anticuerpos se alcanzó a pH ácido seguido de la neutralización inmediata de la muestra. La proteína agregada se separó de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) en Histidina 20mM, NaCl 140 mM pH 6,0. Las fracciones de anticuerpos monoméricos se juntaron, se concentraron, si es necesario usando, por ejemplo un concentrador de centrifuga Millipore Amicon Ultra (30 MWCO) y se almacenaron a -80 °C. Parte de las muestras se utilizaron para el análisis de proteínas posterior y la caracterización analítico por ejemplo mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño, espectrometría de masas y determinación de endotoxinas (véanse las figuras 3 y 4).

SDS-PAGE

Se utilizó el sistema de gel prefabricado de NuPAGE® (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En particular, se utilizaron geles prefabricados NuPAGE® Novex® TRIS-glicina al 4-20 % y un tampón de desarrollo SDS Tris-Glicina de Novex® (véase por ejemplo la Figura 3). La reducción de las muestras se logró mediante la

5

Cromatografía analítica de exclusión por tamaño

Se realizó cromatografía de exclusión por tamaño para la determinación de la agregación y el estado oligomérico de los anticuerpos mediante cromatografía HPLC. Brevemente, los anticuerpos de proteína A purificada se aplicaron a una columna de Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, a pH 7,5 en un sistema de HPLC Agilent 1100 o en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un sistema HPLC de Dionex. La proteína eluida se cuantificó por absorbancia UV e integración de las áreas de los picos. La filtración en gel de BioRad 151-1901 sirvió como estándar. (véase por ejemplo la Figura 4).

10

15

Espectrometría de masas

La masa total desglicosilada de anticuerpos entrecruzados se determinó y se confirmó a través de espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS). Brevemente, 100 µg de anticuerpos purificados se desglicosilaron con 50 mU de N-glucosidasa F (PNGaseF, ProZyme) en KH₂PO₄/K₂HPO₄ 100 mM, a pH 7 a 37 °C durante 12-24 horas a una concentración de proteína de hasta 2 mg / ml y posteriormente se desaló mediante HPLC en una columna de Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa de las correspondientes cadenas pesada y ligera se determinó mediante ESI-MS después de la desglicosilación y la reducción. En breve, 50 µg de anticuerpo en 115 µl se incubaron con 60 µl de TCEP 1M y 50 µl de clorhidrato de guanidina 8 M posteriormente desalada. La masa total y la masa de las cadenas pesada y ligera reducidas se determinó a través de ESI-MS en un sistema Q-Star Elite MS equipado con una fuente NanoMate.

20

25

ELISA de unión a VEGF

Las propiedades de unión de los anticuerpos tetravalentes (TvAb) se evaluó en un ensayo ELISA con proteína VEGF₁₆₅-His de longitud completa (R&D Systems) (Figura 5). Para ello se recubrieron placas de microtitulación Falcon de poliestireno claro mejoradas con 100 µl de VEGF 165 recombinante humano 2 µg / ml (R&D Systems) en PBS durante 2 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (0,2 % de Tween 20) y se bloquearon con 200 µl de BSA 2 % Tween 20 0,1 % durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con 300 µl de PBST. Se añadió a los pocillos 100 µl / pocillo de una serie de dilución (40 pM-0,01pM) de <VEGF-ANG-2> TvAb purificado y como referencia el anticuerpo anti-Ang-2 humano, <ANG-2> Mab536 (Oliner et al., Cancer Cell. Nov 2004; 6 (5) :507-16, US 2006 / 0122370) y el anticuerpo anti VEGF, <VEGF> G6-31 (Liang et al, J. Biol. Chem. Ene 2006 13;281 (2) 951-6l; US 2007 / 0141065) en PBS (Sigma) y se incubó durante 1 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (Tween 20 0,2 %) y el anticuerpo unido se detectó con 100 µl / pocillo 0,1 µg / ml de F(ab') <hFcgamma> POD (Immuno research) en BSA 2 % Tween 20 0,1 % como anticuerpo de detección durante 1 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se eliminó mediante tres lavados con PBST 300 µl / pocillo y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 µl de ABTS / pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor para una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

30

35

40

45

Unión de VEGF: Caracterización cinética de la unión de VEGF a 37 °C por resonancia de plasmón en superficie (Biacore)

Con el fin de corroborar los resultados de ELISA la unión se analizó cuantitativamente la unión a VEGF de anticuerpos <VEGF> G6-31 o Avastin y <VEGF-Ang-2> TvAb6 o TvAb-2441-bevacizumab-LC06 o TvAb-2441-bevacizumab-LC08 utilizando la tecnología de resonancia de plasmón en superficie en un instrumento Biacore T100 de acuerdo con el siguiente protocolo y se analizaron usando el paquete de programas T100: brevemente los anticuerpos <VEGF> se capturaron en un chip CM5 a través de la unión a un anticuerpo de cabra anti IgG humana (JIR 109-005 -098). El anticuerpo de captura se inmovilizó mediante acoplamiento amino utilizando acoplamiento amino estándar como sigue: tampón HBS-N sirve como tampón de desarrollo, la activación se realizó mediante la mezcla de EDC / NHS con el objetivo de obtener una densidad de ligando de 700 RU. El anticuerpo de captura se diluyó en tampón de acoplamiento de NaAc, pH 5,0, C = 2 µg / ml, los grupos carboxilo finalmente aún activados se bloquearon mediante la inyección de etanolamina 1 M. La captura de anticuerpos Mabs <VEGF> se realizó a un flujo de 5 µl / min. y c(Mabs <VEGF>) = 10 nM, se diluyó con tampón de desarrollo + 1 mg / ml de BSA; un nivel de captura de aprox. 30 RU debe ser alcanzado. rhVEGF (rhVEGF, R&D-Systems N° Cat., 293-VE) se utilizó como analito. La caracterización cinética de la unión de VEGF a los anticuerpos <VEGF> se realizó a 37 °C en PBS + Tween 20 0,005 % (v/v) como tampón de desarrollo. La muestra se inyectó con un flujo de 50 µl / min y un tiempo de asociación de 80 seg. y un tiempo de disociación de 1200 seg con una serie de concentración de rhVEGF 300 a

50

55

60

0,29 nM. La regeneración de la superficie libre de anticuerpo de captura se realizó con Glicina 10 mM pH 1,5 y un tiempo de contacto de 60 segundos después de cada ciclo de analito. Las constantes cinéticas se calcularon utilizando el método habitual de doble referencia (referencia de control: unión de rhVEGF a la molécula de captura de cabra anti IgG humana, los blancos en la célula de medición de flujo, la concentración rhVEGF "0", Modelo: unión de Langmuir 1:1, (ajuste de Rmax a local debido a la unión de la molécula de captura). La Figura 11 muestra una vista esquemática del ensayo Biacore.

ELISA de unión a ANG-2

Las propiedades de unión de los anticuerpos tetravalentes (TvAb) se analizaron en un ensayo ELISA con proteína Angiopoyetina-2-His de longitud completa (R&D Systems) (Figura 6a). Para ello se recubrieron placas de microtitulación Falcon de poliestireno claro mejoradas con 100 μ l de Angiopoyetina-2 recombinante humana (R&D Systems, libre de vehículo) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST (0,2 % de Tween 20) y se bloquearon con 200 μ l de BSA 2 % Tween 20 0,1 % durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST. Se añadió a los pocillos 100 μ l / pocillo de una serie de dilución (40 pM-0,01pM) de <VEGF-ANG-2> TvAb purificado y como referencia el anticuerpo <ANG-2> Mab536 y el anticuerpo <VEGF> G6-31 en PBS (Sigma) y se incubaron durante 1 hora en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST (Tween 20 0,2 %) y el anticuerpo unido se detectó con 100 μ l / pocillo 0,1 μ g / ml de F(ab') <hk> POD (Biozol N ° de cat. 206005) en BSA 2 % Tween 20 0,1 % como anticuerpo de detección durante 1 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se eliminó mediante tres lavados con PBST 300 μ l / pocillo y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 μ l de ABTS / pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor para una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

Comparación de unión a ANG-1 y ANG-2 (ELISA de unión a ANG-1 y ANG-2)

Las propiedades de unión de los anticuerpos se analizaron en un ensayo ELISA con proteína Angiopoyetina-2-His de longitud completa (R&D Systems # 623-AN/CF o material producido en casa) o Angiopoyetina-1-His (R&D Systems # 923-AN). Por lo tanto se recubrieron placas de 96 pocillos (placas de microtitulación Falcon de poliestireno claro mejoradas o Nunc Maxisorb) con 100 μ l μ g / ml de Angiopoyetina-1 o Angiopoyetina-2 recombinante humana (sin vehículo) en PBS (Sigma) durante 2 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST (0,2 % de Tween 20) y se bloquearon con 200 μ l de BSA 2 % Tween 20 0,1 % durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST. Se añadió a los pocillos 100 μ l / pocillo de una serie de dilución (40 pM-0,01pM) de anticuerpo de prueba purificado en PBS y se incubó durante 1 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST (Tween 20 0,2 %) y el anticuerpo unido se detectó con 100 μ l / pocillo 0,1 μ g / ml de F(ab') <hk> POD (Biozol N ° de cat. 206005) en BSA 2 % Tween 20 0,1 % como anticuerpo de detección durante 1 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se eliminó mediante tres lavados con PBST 300 μ l / pocillo y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 μ l de ABTS / pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor para una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

BIACORE de unión a ANG-2

La unión de los anticuerpos al antígeno por ejemplo, ANG-2 humana se investigaron por resonancia de plasmón en superficie usando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Brevemente, para las mediciones de afinidad se inmovilizaron anticuerpos policlonales de cabra <hlgG-Fcgamma> sobre un chip CM5 a través de acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos contra Ang-2 humana (Figura 6B). La unión se midió en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,005 %, pH 7,4), 25 °C. Se añadió ANG-2-His purificada (R&D systems o purificada en casa) en varias concentraciones entre 6,25 nM y 200 nM en solución. La asociación se midió mediante una inyección de ANG-2 de 3 minutos; la disociación se midió mediante el lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 3 minutos y un valor de KD se estimó usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. Debido a la heterogeneidad de la preparación de ANG-2 no se pudo observar una unión 1:1, los valores de KD son, pues, sólo estimaciones relativas. Los datos de control negativo (por ejemplo, las curvas de tampón) se restaron de las curvas de la muestra para la corrección del sistema intrínseco de desviación de la línea basal y para la reducción de la señal de ruido. Se utilizó el programa de evaluación Biacore T100 versión 1.1.1 para el análisis de sensogramas y para el cálculo de los datos de afinidad. Alternativamente, Ang-2 se pudo capturar con un nivel de captura de 2000-1700 RU a través de un Anticuerpo PentaHis (PentaHis-Ab-libre de BSA, Qiagen N° 34660) que se inmovilizó sobre un chip CM5 a través de acoplamiento de amina (libre de BSA) (ver más abajo).

La inhibición de la unión de huANG-2 a Tie-2 (ELISA)

El ELISA de interacción se realizó en placas de microtitulación de 384 pocillos (MicroCoat, Alemania, N° de Cat. 464.718) a TA. Después de cada incubación las placas se lavaron 3 veces con PBST. Las placas de ELISA se recubrieron con 0,5 µg / ml de proteína Tie-2 (R & D Systems, Reino Unido, N° de Cat. 313-TI) durante al menos 2 horas (h). A partir de entonces los pocillos se bloquearon con PBS suplementado con 0,2 % de Tween-20 y 2 % de BSA (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) durante 1 h. Las diluciones de los anticuerpos purificados en PBS se incubaron junto con 0,2 µg / ml huAngiopoyetina-2 (R & D Systems, Reino Unido, N° de Cat. 623 -AN) durante 1 h a TA. Después de lavar se añadió una mezcla de 0,5 µg / ml de clon BAM0981 anti-angiopoyetina-2 biotinilado (R & D Systems, Reino Unido) y se estreptavidina HRP diluida 1:3000 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania, N° de Cat. 11089153001) durante 1 h. Posteriormente, las placas se lavaron 6 veces con PBST. Las placas se revelaron con reactivo recién preparado de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Alemania, Tampón N° 204 530 001, tabletas N° 11 112 422 001) durante 30 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 405 nm.

ELISA puente ANG-2-VEGF

Las propiedades de unión de los anticuerpos tetravalentes (TvAb) se analizaron en un ensayo ELISA con proteína VEGF165-His inmovilizada de longitud completa (R&D Systems) y proteína ANG-2-His humana (R&D Systems) para la detección de anticuerpo biespecifico unido (Figura 7). Sólo un anticuerpo biespecifico <VEGF-ANG-2> TvAb es capaz de unirse simultáneamente a VEGF y ANG-2 y así unir los dos antígenos mientras que los anticuerpos IgG1 monoespecificos "estándar" no son capaces de unirse simultáneamente a VEGF y ANG-2 (Figura 7) .

Para ello se recubrieron placas de microtitulación Falcon de poliestireno claro mejoradas con 100 µl de VEGF 165 recombinante humana (R&D Systems) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (0,2 % de Tween 20) y se bloquearon con 200 µl de BSA 2 % Tween 20 0,1 % durante 30 min. a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con 300 µl de PBST. Se añadió a los pocillos 100 µl / pocillo de una serie de dilución (40 pM-0,01pM) de <VEGF-ANG-2> TvAb purificado y como referencia el anticuerpo <ANG-2> Mab536 y el anticuerpo <VEGF> G6-31 en PBS (Sigma) y se incubaron durante 1 hora en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (0,2 % de Tween 20) y el anticuerpo unido se detectó con 100 µl / pocillo 0,5 µg / ml de ANG-2-His humano (R&D Systems) en PBS. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (0,2 % de Tween 20) y el ANG-2 unido se detectó con 100 µl / pocillo 0,5 µg / ml de anticuerpo <ANG-2> mIgG1-Biotina (BAM0981, R&D Systems) durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se eliminó mediante tres lavados con 300 µl de PBST (0,2 % de Tween 20) y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 µl de conjugado estreptavidina-POD 1:2000 de (Roche Diagnostics GmbH, N° Cat. 11089153) diluido 1:4 en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. El conjugado de estreptavidina-POD no unido se eliminó mediante tres a seis lavados con 300 µl de PBST (0,2 % de Tween 20) y el conjugado de estreptavidina-POD unido se detectó mediante la adición de 100 µl de ABTS / pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor para una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

Demostración de la unión simultánea de anticuerpos tetravalentes biespecificos <VEGF-Ang-2> TvAb6 a VEGF-A y Ang-2 mediante Biacore

Con el fin de corroborar los datos del ELISA puente, se estableció un ensayo adicional para confirmar la unión simultánea a VEGF y Ang-2 utilizando la tecnología de resonancia de plasmón en superficie en un instrumento Biacore T100 de acuerdo con el siguiente protocolo y se analizó mediante el paquete de programas T100 (T100 control, Versión 2.01, T100 Evaluation, Versión 2.01, T100 Kinetics Summary, Versión 1.01): Ang-2 se capturó con un nivel de captura de 2000 a 1700 RU en PBS, Tween 20 0,005 % (v / v) en tampón de desarrollo a través de un anticuerpo PentaHis (PentaHis-Ab libre de BSA, Qiagen N ° 34660) que se inmovilizó en un chip CM5 mediante acoplamiento amina (libre de BSA). El tampón HBS-N sirvió como tampón de desarrollo durante el acoplamiento, la activación se realizó mediante la mezcla de EDC/NHS. El anticuerpo de captura PentaHis-Ab libre de BSA se diluyó en tampón de acoplamiento NaAc, pH 4,5, c = 30 µg / ml, finalmente los grupos carboxilo todavía activados se bloquearon mediante inyección de etanolamina 1 M; se analizaron las densidades de ligando de 5000 y 17000 RU. Se capturó Ang-2 con una concentración de 500 nM mediante el PentaHis-Ab a un flujo de 5 µl / min diluido con tampón de desarrollo + 1 mg / ml de BSA. Posteriormente, se demostró la unión del anticuerpo biespecifico <Ang-2, VEGF> a Ang-2 y VEGF mediante la incubación con rhVEGF y la formación de un complejo sándwich. Para ello, el anticuerpo biespecifico <VEGF-Ang-2> TvAb6 se unió a Ang-2 a un flujo de 50 µl / min y a una concentración de 100 nM, se diluyó con tampón de desarrollo + 1 mg / ml de BSA y se detectó la unión simultánea mediante la incubación con VEGF (rhVEGF, R&D-Systems N° de Cat., 293-VE) en PBS + Tween 20 0,005 % (v / v) de tampón de desarrollo a un flujo de 50 µl / min y una concentración de VEGF de 150 nM. Tiempo de asociación 120 seg, tiempo de disociación 1200 seg. La regeneración se realizó después de cada ciclo a un flujo de 50 µl / min con Glicina 2 x 10 mM pH 2,0 y un tiempo de contacto de 60 seg. Los sensogramas se corrigieron utilizando la doble referencia habitual (referencia de control: unión del anticuerpo biespecifico y rhVEGF a la molécula de captura PentaHisAb).

Los blancos para cada Ab se midieron con la concentración "0" de rhVEGF. Un esquema del ensayo Biacore se muestra en la Figura 13. Un formato alternativo de ensayo Biacore se muestra en la Figura 15.

5 Generación de la línea celular HEK293-Tic2

5 Con el fin de determinar la interferencia de anticuerpos angiopoyetina-2 con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 y la unión de ANGPT2 a Tie2 en células, se generó una línea celular HEK293-Tie recombinante. Brevemente, un plásmido basado en pcDNA3 (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) que codifica Tie2 humano de longitud completa (Id. De Sec. N° 108) bajo el control de un promotor de CMV y un marcador de resistencia a la neomicina se transfirió usando Fugene (Roche Applied Science) como reactivo de transfección en células HEK293 (ATCC) y se seleccionaron las células resistentes en DMEM 10 % de FCS, G418 500 µg/ml. Los clones individuales se aislaron a través de un cilindro de clonación, y posteriormente se analizaron para la expresión de Tie2 mediante FACS. El clon 22 fue identificado como clon con alta expresión y estable de Tie2, incluso en ausencia de G418 (HEK293-Tie2 clon 22). El clon 22 HEK293-Tie2 se utilizó posteriormente para ensayos celulares: ensayo de fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT2 y unión al ligando celular ANGPT2.

15 Ensayo de fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT2

20 La inhibición de la fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT2 mediante anticuerpos ANGPT2 se midió de acuerdo con el siguiente ensayo. El clon 22 HEK293-Tie2 se estimuló con ANGPT2 durante 5 minutos en la ausencia o presencia de anticuerpo ANGPT2 y se cuantificó P-Tie2 mediante un ELISA de tipo sándwich. Brevemente, 2×10^5 por pocillo células del clon 22 HEK293-Tie2 se cultivaron durante la noche en una placa microtitulada de 96 pocillos recubierta de poli-D-lisina en 100 µl DMEM, FCS al 10%, 500 µg / ml de genética. Al día siguiente, una fila de titulación de anticuerpos ANGPT2 se preparó en una placa de microtitulación (concentrado 4 veces, volumen final 75 µl / pocillo, duplicados) y se mezcló con 75 µl de una dilución ANGPT2 (R&D systems N° 623-ANJ) (3,2 µg / ml como solución concentrada 4 veces). Los anticuerpos y ANGPT2 se preincubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de la mezcla a las células del clon 22 HEK293-Tie2 (preincubado durante 5 min con 1 mM de NaV3O4, Sigma # S6508) y se incubaron durante 5 min. a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron con 200 µl de PBS enfriado en hielo + NaV3O4 1 mM por pocillo y se lisaron mediante la adición de 120 µl de tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 137 mM, 1 % de NP-40, 10 % de glicerol, EDTA 2 mM, NaV3O4 1 mM, PMSF 1 mM y 10 µg / ml de aprotinina) por pocillo en hielo. Las células se lisaron durante 30 min. a 4 °C en un agitador de placas de microtitulación y 100 µl de lisado se transfirieron directamente a una placa de microtitulación p-Tie2 ELISA (R & D Systems, R & D # DY990) sin centrifugación previa y sin la determinación de proteínas totales. Las cantidades de p-Tie2 se cuantificaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los valores de IC50 para la inhibición se determinaron utilizando análisis XLfit4 para Excel (dosis-respuesta un sitio, modelo 205). Los valores de IC50 se pueden compararse en el experimento, pero podrían variar de un experimento a otro.

35 Ensayo de proliferación de HUVEC inducida por VEGF

40 La proliferación de HUVEC inducida por VEGF (células endoteliales de vena umbilical humana, Promocell # C-12200) se escogió para medir la función celular de los anticuerpos de VEGF. Brevemente, 5000 células HUVEC (de bajo número de pases, ≤ 5 pases) or 96 pocillos se incubaron en 100 µl de medio de inanición (medio basal endotelial 2, EBM-2, Promocell # C-22211, 0,5 % de FCS, Penicilina / estreptomycin) en una placa de microtitulación de 96 pocillos revestida con colágeno 1, BD Biocoat Collagen I (BD # 354407/35640 durante la noche. Diferentes concentraciones de anticuerpo se mezclaron con rhVEGF (concentración final 30 ng/ ml de, BD # 354107) y se preincubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió la mezcla a las células HUVEC y se incubaron durante 72 h a 37 °C, CO2 5 %. El día del análisis la placa se equilibró a temperatura ambiente durante 30 min. y se determinó la viabilidad celular / proliferación, usando el equipo de ensayo de viabilidad celular luminiscentes CellTiter-GloTM de acuerdo con el manual (Promega, # G7571/2/3). La luminiscencia se determinó en un espectrofotómetro .

50 Diseño de anticuerpos monoespecíficos tetravalentes y anticuerpos biespecíficos tetravalentes (de referencia)

55 Los anticuerpos biespecíficos que se unen a VEGF (VEGF-A) y ANG-2 (angiopoyetina-2) comprenden un primer sitio de unión a antígeno que se une a VEGF y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ANG-2. Como primer sitio de unión a antígeno que se une a VEGF, por ejemplo, se puede utilizar el dominio de cadena pesada variable de Id. de Sec. N°: 23, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 24 que derivan ambos del anticuerpo anti-VEGF, G6-31 derivado de la presentación de fagos humana que se describe en detalle en Liang, WC, et al., J Biol Chem. 281 (2) (2006) 951-61, y en US 2007/0141065. Alternativamente, por ejemplo, el segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF comprende los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 7, o Id. de Sec. N°: 100, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°:8 o Id. de Sec. N°: 101 de los anticuerpos anti-VEGF <VEGF> bevacizumab y <VEGF> B20-4.1, preferiblemente de <VEGF> bevacizumab.

Como segundo sitio de unión a antígeno se puede utilizar los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 31, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 32 o Id. de Sec. N°: 32 con las mutaciones T92L, H93Q y W94T (numeración de Kabat), que derivan ambos del anticuerpo humano anti-Ang-2 <ANG-2> Mab536 que se describe en detalle en Oliner, J., et al., Cancer Cell. 6 (5) (2004) 507-16, y en US 2006 / 0122370. Alternativamente, por ejemplo, el segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a ANG-2 comprende los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 68, Id. de Sec. N°: 76, Id. de Sec. N°: 84 o Id. de Sec. N°: 92, y los dominios variables de cadena ligera de Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 69, Id. de Sec. N°: 77, Id. de Sec. N°: 85, Id. de Sec. N°: 93 de los anticuerpos anti- Ang-2 <ANG-2> Ang2s_R3_LC03, <ANG-2> Ang2i_LC06, <ANG-2> Ang2i_LC07, <ANG-2> Ang2k_LC08, <ANG-2> Ang2s_LC09, <ANG-2> Ang2i_LC10 o <ANG-2> Ang2k_LC11, preferiblemente de <ANG-2> Ang2i_LC06 o <ANG-2> Ang2k_LC08.

Para generar agentes que combinan características de ambos anticuerpos, se construyeron nuevas entidades de proteínas derivadas de anticuerpos biespecíficos tetravalentes. En estas moléculas, las moléculas de unión de una sola cadena recombinante de un anticuerpo están conectadas mediante tecnología de fusión de proteínas recombinantes con el otro anticuerpo que se retuvo en el formato de una IgG1 de longitud completa. Este segundo anticuerpo lleva la segunda especificidad de unión deseada.

Mediante la síntesis de genes y técnicas de biología molecular recombinantes, la cadena pesada del dominio variable (VH) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo correspondiente estaban unidos mediante un enlazante de cadena sencilla glicina serina (G4S)3 o (G4S)4 para proporcionar un Fv de cadena sencilla (scFv), que se unió al extremo C-terminal de la otra cadena pesada de anticuerpo usando un enlazante (G)6 o (G4S)3.

Además, los residuos de cisteína se introdujeron en el dominio VH (incluyendo la posición de Kabat 44) y VL (incluyendo la posición Kabat 100) del scFv que se une a ANG-2 o VEGF como se describió anteriormente (por ejemplo, WO 94 / 029350; Reiter, Y., et al., Nature Biotechnology (1996) 1239-1245; Young, N.M., et al., FEBS Letters (1995) 135-139; o Rajagopal, V., et al, Protein Engineering (1997) 1453-1459).

Todas estas moléculas se produjeron de forma recombinante, se purificaron y se caracterizaron y se analizaron la expresión de proteínas, estabilidad y actividad biológica.

Un resumen de los diseños de anticuerpo biespecífico que se aplicaron para generar los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <VEGF-ANG-2>, <ANG-2-VEGF> y los anticuerpos tetravalentes mono-específicos <ANG-2> se proporcionan en la Tabla 3. Para este estudio, se utiliza el término "TvAb" para describir las diversas entidades de proteínas tetravalentes.

Con el fin de obtener los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <VEGF-ANG-2> TvAb5 y TvAb6 el Fv de cadena sencilla (scFv) de unión a la angiopoyetina-2 derivado del dominio variable de la cadena pesada (VH) de la Id. de Sec. N°: 31, y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del Id. de Sec. N°: 32 con las mutaciones T92L, H93Q y W94T derivado del anticuerpo humano anti- Ang-2 <ANG-2> Mab536 se fusionó con la secuencia correspondiente al C-terminal del vector de la cadena pesada del anticuerpo humano anti-VEGF <VEGF> G6-31 de Id. de Sec. N°: 23 y se coexpresó con el vector de expresión de la cadena ligera correspondiente basado en el Id. de Sec. N°: 24. Una representación de los formatos diseñados se muestran en la Figura 1B y se enumeran en la Tabla 3.

Con el fin de obtener los anticuerpos tetravalentes biespecíficos TvAb9 y TvAb15 el Fv de cadena sencilla (scFv) de unión a VEGF derivado del dominio variable de cadena pesada (VH) del Id. de Sec. N°: 23, y el dominio variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N°: 24 derivado del anticuerpo humano anti-VEGF <VEGF> G6-31 se fusionó con la secuencia correspondiente al C-terminal del vector de la cadena pesada del anticuerpo anti-Ang-2 humano <ANG-2> Mab536 de Id. de Sec. N°: 31 y se coexpresó con el vector de expresión de la cadena ligera correspondiente basado en el Id. de Sec. N°: 32. Una representación de los formatos diseñados se muestra en la Figura 1B y se enumera en la Tabla 3.

Tabla 3 - Los diferentes formatos de anticuerpos tetravalentes biespecíficos con scFv unidos a C-terminal y la correspondiente nomenclatura TvAb. Un "-" en la tabla significa "no presente"

Nombre de la molécula (nomenclatura TvAb para anticuerpos biespecíficos)	Esqueleto de anticuerpo derivado de	scFv derivado de	Dominios variables VH y VL: Id. de Sec. N°:	Posición de unión de scFv al anticuerpo	Enlazante de cadena sencilla	Enlazante peptídico	scFv estabilizado con disulfuro VH44 / VL100
G6 = 31 (1000)	<hVEGF>G6-31	-	23 + 24	-	-	-	-
Mab536 (1000)	<ANG-2> Mab536	-	31 + 32	-	-	-	-
bevacizumab	<VEGF>	-	23 + 24	-	-	-	-

	bevacizumab						
Ang2i_LC06 (LC06)	<ANG-2> Ang2i_LC06	-	52 + 53	-	-	-	-
Ang2k_LC06 (LC08)	<ANG-2> Ang2k_LC08	-	68 + 69				
TvAb5 (2310)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23 + 24, 31 + 32 con las mutaciones T92L, H93Q y W 94T	C-term. HC	(G4S)3	(G)6	-
TvAb6 (2331)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23 + 24, 31 + 32 con las mutaciones T92L, H93Q y W94T	C- term. HC	(G4S)3	(G4S)3	scFv estabilizado con disulfuro VH44/VL 100
TvAb9 (2330)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> > G6-31	31 + 32 y 23 + 24	C-term. HC	(G4S)3	(G4S)3	-
TvAb15 (2431)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> 31 + 32, > G6-31	31 + 32 y 23 24	C-term. HC	(G4S)4	(G4S)3	scFv estabilizado con disulfuro VH44NL 100
TvAb-2441-bevacizumab-LC06	bevacizumab	LC06	7 + 8 y 52 + 53	C-term. HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv estabilizado con disulfuro VH44NL 100
TvAb-2441-bevacizumab-LC08	bevacizumab	LC08	7 + 8 y 68 + 69	C-term. HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv estabilizado con disulfuro VH44NL 100
TvAb-3421-bevacizumab_LC06	bevacizumab	LC06	7 + 8 y 52 + 53	N-term. HC	(G4S)4	(G4S)2	scFv estabilizado con disulfuro VH44NL 100
TvAb-4421-bevacizumab_LC06	bevacizumab	LC06	7 + 8 y 52 + 53	C- term LC	(G4S)4	(G4S)2	scFv estabilizado con disulfuro VH44NL 100
TvAb-4461-bevacizumab_LC06	bevacizumab	LC06	7 + 8 y 52 + 53	C-term LC	(G4S)4	(G4S)6	scFv estabilizado con disulfuro VH44/VL 100

Los formatos TvAb se basan, por ejemplo, en

- 5 a) aa) el anticuerpo humano anti-VEGF <VEGF> G6-31 y ab) dos Fv de cadena sencilla (scFv) que se unen a la angiopoyetina-2 derivado del dominio variable de la cadena pesada (VH) del Id. de Sec. N°: 31, y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del Id. de Sec. N°: 32 con las mutaciones T92L, H93Q y W94T, que están unidos al C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF <VEGF> G6-31 (Id. de Sec. N°: 23), o
- 10 b) ba) el anticuerpo humano anti-Ang-2 <ANG-2> Mab536 y bb) dos Fv de cadena sencilla (scFv) que se unen a VEGF derivado del dominio variable de la cadena pesada (VH) del Id. de Sec. N°: 23, y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del Id. de Sec. N°: 24, que están unidos al C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-Ang-2, <ANG-2> Mab536 (Id. de Sec. N°: 31), o
- 15 c) ca) el humano anticuerpo anti-VEGF <VEGF> bevacizumab (Avastin) y cb) dos Fv de cadena sencilla (scFv) que se unen a la Angiopoyetina-2 derivado del dominio variable de la cadena pesada (VH) del Id. de Sec. N°: 52 o Id. de Sec. N°: 68, y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del Id. de Sec. N°: 53 o Id. de Sec. N°: 69, que están unidos al C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF, <VEGF> bevacizumab (Avastin) (las secuencias del péptido de fusión resultante son el Id. de Sec. N°: 102 o Id. de Sec. N°: 103, que se coexpresó con la cadena ligera de bevacizumab de Id. de Sec. N°: 104. (Alternativamente dos Fv de cadena sencilla (scFv) que se unen a la Angiopoyetina-2 también pueden estar unidos al C-terminal de la cadena ligera o el N-terminal de la cadena pesada).
- 20

Alternativamente para los dos Fv de cadena sencilla (scFv) también pueden utilizarse fragmentos Fab de una sola cadena como se ha descrito anteriormente (usando conectores peptídicos para la fusión con los extremos C o N-terminales), en la solicitud EP. N° 09004909.9 y en el Ejemplo 10.

5 Ejemplo 1 (Referencia)

Expresión y purificación de anticuerpos tetravalentes biespecíficos

<VEGF-ANG-2> TvAb5, TvAb6, TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08

10 Las cadenas ligera y pesada de los correspondientes anticuerpos biespecíficos tetravalentes TvAb5 y TvAb6 se construyeron en vectores de expresión genómicos tal como se describió anteriormente. Los plásmidos se amplificaron en *E. coli*, se purificaron, y posteriormente se transfectaron para la expresión transitoria de proteínas recombinantes en células HEK293-F (utilizando el sistema de Invitrogen FreeStyle 293). Después de 7 días, los sobrenadantes de las células HEK 293-F se recogieron, se filtraron y los anticuerpos biespecíficos se purificaron mediante proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. La homogeneidad de todas las construcciones de anticuerpos biespecíficos se confirmó mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras y mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Bajo condiciones reductoras (Figura 3), los polipéptidos de las cadenas pesadas de <VEGF-ANG-2> TvAb6 que llevan la fusión scFv en C-terminal mostraron tras el SDS-PAGE tamaños moleculares considerables de aprox. 75 kDa, análogos a los pesos moleculares calculados. La espectrometría de masas confirmó la identidad de las construcciones de anticuerpos purificados. Los niveles de expresión de todas las construcciones fueron analizados mediante HPLC de proteína A y fueron similares a los rendimientos de expresión de IgG "estándar". Los rendimientos de proteína alcanzaron hasta 150 mg de TvAb6 <VEGF-ANG-2> por litro de sobrenadante de cultivo celular como se determinó mediante el HPLC de proteína A de.

25 El análisis por cromatografía de exclusión por tamaño de la construcción purificada no estabilizada por puentes disulfuro TvAb5 con el C- terminal de scFv fusionado a la cadena pesada mostró en comparación a los IgG "estándar" una mayor tendencia a agregarse de nuevo después de la purificación del anticuerpo monomérico mediante cromatografía de exclusión por tamaño (el llamado fenómeno de "conexión en cadena"). Este hallazgo ha sido apoyado por otros ejemplos (Rajagopal, V., et al, Prot. Engin. (1997) 1453-1459; Kobayashi, H., et al, Nucl. Med. Biol. (1998) 387-393 o Schmidt, M., et al, Oncogene (1999) 18, 1711-1721) mostraron que las moléculas que contenían scFv que no se estabilizaban mediante disulfuros intercatenarios entre VH y VL mostraron un aumento de la tendencia a agregarse y rendimientos reducidos. Para hacer frente a los problemas con la agregación de tales anticuerpos biespecíficos, se aplicó estabilización con disulfuros de las porciones de scFv. Para ello se introdujeron sustituciones de cisteína individuales dentro de VH y VL del scFv en las posiciones definidas (posiciones VH44/VL100 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat). Estas mutaciones permiten la formación de disulfuros intercatenarios estables entre VH y VL, que a su vez estabilizan el módulo resultante de scFv estabilizado por disulfuro. La introducción de los disulfuros VH44/VL100 en el scFv en el extremo C-terminal de la Fv en TvAb6 <VEGF-ANG-2> conducen a un anticuerpo tetravalente estable que no mostró ninguna tendencia a la agregación por más tiempo después de la purificación y se mantuvo en un estado monomérico (figura 4). Además, TvAb6 <VEGF-ANG-2> no mostró aumento en la tendencia a la agregación tras los ciclos de congelación-descongelación por ejemplo, en la concentración aplicada in vitro e in vivo de 3 mg / kg.

45 Todo el resto de moléculas TvAb descritas en la Tabla 3 (por ejemplo TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08) se prepararon y caracterizaron analíticamente de forma análoga al procedimiento descrito.

Ejemplo 2 (Referencia)

50 Unión simultánea del anticuerpo tetravalente biespecífico <VEGF-ANG-2> TvAb6, TvAb -2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 a VEGF-A y ANG-2

55 La unión de los módulos de scFv y de Fv retenidos en el módulo de IgG de los diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos se compararon con la unión de las IgG de tipo "salvaje" de los que proceden los módulos de unión y anticuerpos biespecíficos. Estos análisis se llevaron a cabo a concentraciones equimolares mediante la realización de pruebas bioquímicas ELISA de unión y mediante la aplicación de resonancia de plasmón en superficie (Biacore) .

60 Para <VEGF-ANG-2> TvAb6 se mostró mediante ELISA de unión a VEGF como se ha descrito anteriormente que se une a VEGF de forma comparable a su anticuerpo parental G6-31 en una concentración equimolar de 0,625 pM (Figura 5). Este hallazgo podría esperarse ya que la región Fv de la TvAb es idéntica a la de G6-31. La ligera diferencia entre <VEGF-ANG-2> TvAb6 y <VEGF> G6-31 se debe a pequeñas diferencias en la concentración de proteína y una ligera interferencia estérica del scFv C-terminal con la unión del anticuerpo de detección <hFc>-POD y se puede superar mediante la aplicación de un anticuerpo de detección de <hk> POD (Biozol No. Cat. 206005) como el utilizado para el ELISA de unión a ANG-2.

Estos resultados fueron confirmados mediante Biacore utilizando una serie de concentración clásica a 37 ° C (Figura 11). Estos datos mostraron rápidas tasas de asociación K, k(a) de 4,7 a 4,8 E+6 1/(Ms), se llegó a la saturación con las más altas concentraciones de VEGF. Las tasas de disociación K alcanzan los límites de especificación técnica. (Es decir, 5 x E-6 (s / s), probablemente debido a la todavía unión bivalente (efecto de avidéz) en estas condiciones como consecuencia del analito dimérico rhVEGF, aunque se utilizó una densidad de ligando muy baja resultando en una respuesta final de VEGF de 10-15 RU. Sin embargo, las constantes cinéticas de los diferentes anticuerpos <VEGF> podrían ser comparados por este método y dentro del error del método no hubo diferencia significativa en las constantes cinéticas del anticuerpo tetravalente biespecífico <VEGF-Ang-2> TvAb6 y el anticuerpo original <VEGF> G6-31 detectable. Las constantes cinéticas para <VEGF-Ang-2> TvAb6 y <VEGF> G6-31 en estas condiciones fueron prácticamente idénticas por este método. Por lo tanto, se puede concluir que TvAb6 retuvo completamente sus propiedades de unión a VEGF. La tabla 4 muestra las respectivas constantes cinéticas y la Figura 12 muestra las características cinéticas de los dos anticuerpos <VEGF>, <VEGF-Ang- 2> TvAb6 y <VEGF> G6-31 en una gráfica Ka-Kd.

15 Tabla. 14: propiedades cinéticas de <VEGF-Ang-2> TvAb6 y <VEGF> G6-31

Medido a 37 °C	Ka	kd	t1 / 2	KD
Anticuerpos	[1/(Ms)]	[1/s]	[min]	[M]
<VEGF> G6-31	4,83E +06	9,33E-06	1237,8	1,93E-12
<VEGF-Ang-2> TvAb6	4,72E +06	7,24E-06	1596,7	1,53E-12

En un experimento adicional, se demostró por el ELISA de unión a Ang-2 usando un anticuerpo de detección <hk>-POD (Biozol N ° Catálogo 206005) como se describe anteriormente que <VEGF-ANG-2> TvAb6 se une a Ang-2 de una manera comparable a la de Mab536 a una concentración equimolar de 0,039 pM (Figura 6A). Esto demostró que el módulo de scFv de TvAb6 retuvo sus propiedades de unión en la construcción TvAb .

Con el fin de corroborar este hallazgo <ANG-2> Mab536 y <VEGF-ANG-2> TvAb6 fueron inmovilizados por un anticuerpo secundario en un chip Biacore CM5 y se determinó la cinética de unión a ANG-2 humana. Debido a la heterogeneidad de la preparación de ANG-2, no se observó unión 1:1, los valores de KD son, pues, sólo estimaciones relativas. El análisis Biacore demostró que <VEGF-ANG-2> TvAb6 tiene un valor estimado de KD de 4,4 nM para ANG-2. En comparación, Mab536 tiene un valor KD estimada de 1,6 nM. Dentro del error del método de no se puede observar diferencias en el modo de unión y las afinidades entre <ANG-2> Mab536 y <VEGF-ANG-2> TvAb6 (Figura 6B). Por lo tanto, se puede concluir que el módulo de scFv de TvAb6 retiene completamente sus propiedades de unión en la construcción TvAb .

Con el fin de probar que <VEGF-ANG-2> TvAb6 fue capaz de unirse simultáneamente a VEGF y ANG-2 se aplicaron ensayos ELISA puente y ensayos Biacore como se describe más arriba.

Mediante la aplicación de la prueba ELISA puente descrito anteriormente a VEGF-ANG-2 se demostró que sólo <VEGF-ANG-2> TvAb6 fue capaz de unirse simultáneamente a VEGF y ANG-2 a una concentración equimolar de 0,625 pM mientras que los anticuerpos monoespecíficos IgG1 "estándar" <ANG-2> Mab536 y <VEGF> G6-31 no fueron capaces de unirse simultáneamente a VEGF y ANG-2 (Figura 7) .

La Figura 14 muestra los datos respectivos a partir del ensayo Biacore. La unión simultánea de ambos antígenos Ang-2 y VEGF puede mostrarse para el anticuerpo biespecífico tetravalente <VEGF-Ang-2> TvAb6. Los controles negativos fueron como se esperaba: El anticuerpo monoespecífico <Ang-2> Mab536 mostró sólo la unión a Ang-2, pero no la unión de VEGF. El anticuerpo monoespecífico <VEGF> G6-31 mostró unión a VEGF, pero ninguna unión a Ang-2 en absoluto (datos no mostrados). De las unidades de respuesta relativa del anticuerpo biespecífico tetravalente <VEGF-Ang-2> TvAb6 unido a la superficie recubierta de Ang-2, y la posterior unión a VEGF dimérica, se pudo calcular la estequiometría de unión en el intervalo de 1:1 a 1:1,4. Tomados en conjunto, mediante la aplicación de los ensayos de ELISA y Biacore descritos, se demostró que sólo <VEGF-Ang-2> TvAb6 fue capaz de unirse simultáneamente a VEGF y Ang-2, mientras que los anticuerpos monoespecíficos IgG1 "estándar" y <Ang-2> Mab536 y <VEGF> G6-31 no fueron capaces de unirse simultáneamente a VEGF y Ang-2 (Figura 15) .

Se obtuvieron resultados similares con las construcciones TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 en un ensayo Biacore análogo mostrado en la figura. 15A. La unión de los anticuerpos al antígeno, por ejemplo, ANG-2 humano y VEGF se investigaron por resonancia de plasmón en superficie usando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Brevemente, para las mediciones de afinidad anticuerpos policlonales de cabra <hlgG-Fch> fueron inmovilizados en un chip CM4 a través de acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos biespecíficos contra ANG-2 humana y VEGF. La unión se midió en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, 0,005 % de Tween 20, pH 7,4), 25 °C. Se le añadió ANG-2-His purificada (R&D systems o purificación casera) en varias concentraciones entre 6,25 nM y 200 nM en solución. La asociación se midió mediante una inyección de ANG-2 de 3 minutos; la disociación se midió mediante el lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 3 minutos y el valor de KD se calculó usando

un modelo de unión Langmuir 1:1. Debido a la heterogeneidad de la preparación de ANG-2 no se pudo observar unión 1:1; los valores KD son, pues sólo estimaciones relativas.

5 VEGF (R&D systems) se añadió en varias concentraciones entre 6,25 nM y 200 nM en solución. La asociación se midió mediante inyección de VEGF de 3 minutos; la disociación se midió mediante el lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 3 minutos y el valor de KD se calculó usando un modelo de unión de Langmuir 1:1.

El orden de inyección de las parejas de unión puede conmutarse, primero VEGF y luego Ang2 o viceversa.

10 Los datos de control negativo (por ejemplo, curvas de tampón) se restaron de las curvas de muestra para la corrección del sistema intrínseco deriva de referencia y para la reducción de la señal de ruido. Se utilizó el programa Biacore T100 Evaluation versión 1.1.1 para el análisis de sensogramas y para el cálculo de los datos de afinidad.

Anticuerpo	Afinidad por hAng-2	Afinidad por hVEGF
TvAb-2441-bevacizumab-LC06	2,3 nM	0,35 nM
TvAb-2441-bevacizumab-LC08	0,7 nM	0,34 nM
G6-31	--	< 0,1 nM
MAb536	3 nM	--
bevacizumab	--	0,59 nM

15 Finalmente, la unión simultánea de TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 puede mostrarse incubando con ANGPT2 y VEGF de forma consecutiva. Tal como se muestra en la Figura 15B, ANGPT2 y VEGF pueden unirse simultáneamente a los anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo 3 (Referencia)

20 La eficacia in vivo del anticuerpo biespecifico tetravalente estabilizado con puentes disulfuro <VEGF-ANG-2> TvAb6 en comparación con <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 y la combinación de Mab536 y G6-31 en el modelo de xenoinjerto subcutáneo por estadíos Colo205 en ratones SCID de color beige

25 El anticuerpo estabilizado con puentes disulfuro <VEGF-ANG-2> TvAb6 purificado (n00.2331 ver Tabla 3) se comparó con los anticuerpos <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6- 31 y la combinación de <ANG-2> Mab536 y <VEGF> G6-31 en dos estudios en modelos de xenoinjertos subcutáneos por estadíos Colo205 (Ang2_PZ_Colo205_003 y Ang2_PZ_Colo205_005) en ratones de color beige Scid hembra en diferentes dosis.

30 Anticuerpos: <ANG-2> Mab536 se proporciona como solución madre congelada (c = 4,5 mg / ml), <VEGF> G6-31 se proporciona como solución congelada (c = 0,6 mg / ml) y <VEGF-ANG-2> TvAb6 se proporciona como solución madre congelada (c = 0,5 mg / ml) en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. La solución de anticuerpo se diluyó apropiadamente en PBS a partir de una solución madre antes de las inyecciones en donde se requirió y PBS se aplicó como vehículo.

35 Líneas celulares y condiciones de cultivo: las células cancerosas colorrectales humanas Colo205 se obtuvieron originalmente de ATCC y después de la expansión se depositaron en el banco de células interna Roche Penzberg. La línea celular tumoral se cultivó de forma rutinaria en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories, Austria) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM, a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5%. Se utilizaron de 2 a 5 pases para el trasplante.

40 Animales: ratones SCID hembra de color beige, con una edad de 4-5 semanas a la llegada (comprado de Charles River Alemania) se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 horas de luz / 12 h de oscuridad según las guías (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local. Después de la llegada de los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de las instalaciones de animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo del estado de su salud de manera regular. Alimentos (Provimi Kliba 3337) y agua (pH acidificado 2,5-3) se proporcionaron ad libitum. La edad de los ratones al inicio del estudio fue de aproximadamente 10 semanas. Monitorización: Los animales fueron controlados diariamente por síntomas clínicos y detección de efectos adversos. Para el seguimiento a lo largo del experimento se documentó el peso corporal de los animales y el volumen del tumor se midió mediante pie de rey después del estadiado .

55 Inyección de células tumorales: En el día de la inyección se centrifugaron las células Colo205, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Después de un lavado adicional con PBS se determinó la concentración de células y el tamaño de las células utilizando un contador de células y un sistema analizador (VI-CELL, Beckman Coulter). Para la inyección de las células Colo205, la concentración final se ajustó a 5,0 x 10⁷ células / ml, la viabilidad aprox. 90 %. Posteriormente, 100 µl de esta suspensión correspondientes a 2,5 * 10⁶ células por animal se inyectó s.c. en el flanco derecho de los ratones.

El tratamiento de los animales comenzó en el día de la aleatorización, 16 días después del trasplante de células (estudio Ang2_PZ_Colo205_003) y 14 días después del trasplante de células (estudio Ang2_PZ_Colo205_005) a un volumen tumoral medio de 100 mm³, o 150 mm³, respectivamente .

5

Calendario de dosis hasta el día 74 (ver Fig. 8A) del estudio Ang2_PZ_Colo205_003:

Grupo	Nº de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Ruta/Modo de administración	Nº de tratamientos	Dosis acumulada mg/kg
1	10	Vehículo		i.p. una vez por semana	4	
2	10	<VEGF> G6-31	6 mg/kg	i.p. una vez por semana	8	48
3	10	<ANG-2> Mab536	6 mg/kg	i.p. una vez por semana	8	48
4	10	<VEGF> G6-31 + <ANG-2> Mab536	5mg/kg + 6 mg/kg	i.p. una vez por semana i.p. una vez por semana	8 8	40 48
5	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	7mg/kg	i.p. una vez por semana	8	56

10 En el estudio Ang2_PZ_Colo205_003 <VEGF-ANG-2> TvAb6 fueron por error infradosificados con respecto a una relación equimolar. La dosis de <VEGF-ANG-2> TvAb6 se ajustó en el estudio Ang2_PZ_Colo205_005 de manera que los animales recibieron una relación equimolar de sitios de unión de Ang-2 y VEGF mediante <VEGF-ANG-2> TvAb6 así como la combinación de <VEGF> G6 -31 y <ANG-2> Mab536 .

15 Inhibición del crecimiento tumoral hasta el día 74 (véase la figura 8a) estudio Ang2-PZ-Colo205_003:

15 <VEGF-ANG-2> TvAb6 a una dosis de 7 mg / kg mostró una eficacia comparable a la de la combinación de <VEGF> G6-31 a 5 mg / kg y <ANG-2> Mab536 a 6 mg / kg y <VEGF> G6-31 como agente único en dosis de 6 mg / kg (Figura 8A) y fue superior a la de un solo agente <ANG-2> Mab536 a una dosis de 6 mg / kg. Ya que el modelo subcutánea Colo205 es muy sensible al anticuerpo <VEGF> G6-31 que bloquea el VEGF humano y el murino, resulta en la inhibición del crecimiento del tumor casi completa, <VEGF-ANG-2> TvAb6 no pudo por lo tanto diferenciarse de G6-31 como agente único (6 mg / kg) en las condiciones experimentales elegidas, mientras que <VEGF-ANG-2> TvAb6 mostró una inhibición comparable como la combinación de <ANG-2> Mab536 y <VEGF> G6-31 a una dosis acumulativa claramente inferior (<VEGF-ANG-2> TvAb6 = 56 mg / kg de anticuerpo en comparación con la combinación de <ANG-2> Mab536 y <VEGF> G6-31 = 40 + 48 = 88 mg / kg de anticuerpo) .

25

Calendario de dosis hasta el día 63 del estudio Ang2_PZ_Colo205_005:

Grupo	Nº de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Ruta/Modo de administración	Nº de tratamientos	Dosis acumulada mg/kg
6	10	Vehículo		i.p. una vez por semana	6	
7	10	<VEGF> G6-31	3	i.p. una vez por semana	7	21 mg/kg
8	10	<VEGF> G6-31 + <ANG-2> Mab536	3 3	i.p. una vez por semana i.p. una vez por semana	7 7	21 mg/kg 21 mg/kg
9	10	< ANG-2> Mab536	3	i.p. una vez por semana	7	21 mg/kg
10	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	4	i.p. una vez por semana	7	28 mg/kg

30 Inhibición del crecimiento tumoral hasta el día 63 del estudio Ang2_PZ_Colo205_005:

30 <VEGF-ANG-2> TvAb6 a una dosis de 4 mg / kg mostró una eficacia comparable a la de la combinación de <VEGF> G6-31 y <ANG-2> Mab536 a 3 mg / kg cada uno y fue superior a cualquiera de los agentes únicos <VEGF> G6-31, así como <ANG-2> Mab536 a una dosis de 3 mg / kg (Figura 8B). Este es el primer ejemplo que muestra que a una dosis inferior (con respecto a la concentración resumida de anticuerpo-la dosis acumulativa de la combinación es 21+21 = 42 mg / kg frente a 28 mg / kg del anticuerpo biespecífico TvAb6) un anticuerpo biespecífico dirigido contra VEGF y ANG-2 puede dar lugar a una fuerte eficacia antitumoral comparable a la combinación de los respectivos agentes únicos de bloqueo de VEGF y ANG-2 y superior a cualquiera de los agentes únicos.

35

40 Ejemplo 4 (referencia)

Bloqueo de la formación del tubo inducida por VEGF

Con el fin de confirmar que las actividades relacionadas con anti-VEGF se retuvieron en el anticuerpo tetravalente biespecífico <VEGF-ANG-2> TvAb6 se demostró en un ensayo de formación de tubo inducida por VEGF AngioKit TCS CellWorks (CellSystems) que <VEGF-ANG-2> TvAb6 media la inhibición dependiente de la dosis de la formación del tubo comparable a la del anticuerpo mono específico <VEGF> G6-31. El ensayo AngioKit TCS CellWorks se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: Las células se estimularon cada vez con 2 ng / ml de VEGF antes del tratamiento con anticuerpos en el día 1, 4, 7 y 9. Los tubos vasculares se visualizaron por tinción de las células endoteliales utilizando un anticuerpo CD31-PE (BD Pharmingen # 555446) en el día 11. Se tomaron fotografías con un aumento de 4x y los valores para la longitud del tubo y el número de puntos de ramificación fueron cuantitativamente analizadas usando el módulo de aplicación de formación de tubos por angiogénesis en MetaMorph (Molecular Devices). Los valores y la desviación estándar se calcularon mediante duplicados y se realizaron análisis de 4 imágenes por muestra. La Figura 9 muestra los correspondientes resultados y la Figura 10 A y B, el análisis cuantitativo. La Angiopoyetina-2 no tiene ninguna influencia en la formación del tubo y por lo tanto la inhibición de la ANG-2 no se ha estudiado en este ensayo. Los datos muestran que el anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2> TvAb6 y el anticuerpo mono específico <VEGF> G6-31 son igualmente eficaces en la inhibición de la formación del tubo estimulada por VEGF.

Ejemplo 5 (Referencia)

Fosforilación de Tie2

Con el fin de confirmar que las actividades relacionadas con anti-ANGPT2 se retuvieron en los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <VEGFANGPT2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 se demostró que TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 interfieren con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 de una manera comparable como sus clones madre LC06 y LC08 en el ensayo de fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 como se ha descrito anteriormente.

En un primer experimento ambos anticuerpos biespecíficos TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 mostraron una interferencia dependiente de la dosis con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con valores de CI50 comparables a los de los clones madre LC06 y LC08 como se muestra en la Figura 16A. Tvab-2441-bevacizumab-LC06 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de aprox. 721 ng / ml, mientras que LC06 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de aprox. 508 ng / ml. Tvab-2441-bevacizumab-LC08 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de approx. 364 ng / ml, mientras que LC08 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de approx.499 ng / ml .

En un segundo experimento ambos anticuerpos biespecíficos TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 mostraron una interferencia dependiente de la dosis con la fosforilación de Tie2 estimulada con ANGPT2 con valores de CI50 comparables a los de los clones madre LC06 y LC08 como se muestra en la Figura 16B. Tvab-2441-bevacizumab-LC06 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de aprox. 488 ng / ml, mientras que LC06 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de aprox. 424 ng / ml. Tvab -2441-bevacizumab-LC08 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de aprox. 490 ng / ml, mientras que LC08 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de aprox. 399 ng / ml .

En conjunto, estos datos muestran que los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <VEGF-ANGPT2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 interfieren con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 en una manera comparable a la de los clones madre LC06 y LC08 dentro del error de este ensayo celular .

Ejemplo 6 (Referencia)

Inhibición de la unión de huANG-2 a Tie-2 (ELISA)

El ELISA de interacción se realizó en placas de microtitulación de 384 pocillos (MicroCoat, Alemania, N° de Cat. 464.718) a TA. Después de cada incubación las placas se lavaron 3 veces con PBST. Las placas de ELISA se recubrieron con 0,5 µg / ml de proteína Tie-2 (R & D Systems, Reino Unido, N° de Cat. 313-T1) durante al menos 2 horas (h). A partir de entonces los pocillos se bloquearon con PBS suplementado con 0,2 % de Tween-20 y 2 % de BSA (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) durante 1 h. Las diluciones de los anticuerpos purificados en PBS se incubaron junto con 0,2 µg / ml huAngiopoyetina-2 (R & D Systems, Reino Unido, N° de Cat. 623 -AN) durante 1 h a TA. Después de lavar se añadió una mezcla de 0,5 µg / ml de clon BAM0981 anti-angiopoyetina-2 biotinilado (R & D Systems, Reino Unido) y se estreptavidina HRP diluida 1:3000 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania, N° de Cat. 11089153001) durante 1 h. Posteriormente, las placas se lavaron 6 veces con PBST. Las placas se revelaron con reactivo recién preparado de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Alemania, Tampón N° 204 530 001, tabletas N° 11 112 422 001) durante 30 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 405 nm.

Resumen de datos de para el ELISA de interacción de Ang2:

<VEGF-ANG-2> anticuerpo biespecífico (o anticuerpos mono-específicos parentales)	AVG CI50 (ng / ml)	DesvEst
	hANG2	
<VEGF-ANG-2> G6_31	> 20000	
TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	75	39
TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	66	31
TvAb-2441_bevacizumab_LC06	44	8
TvAb-2441_bevacizumab_LC08	42	11
<ANG-2> Mab 536	15	8
<VEGF> Bevacizumab	> 20000	
TvAb-3421_bevacizumab_LC06	31	1
TvAb-4421_bevacizumab_LC06	35	17
TvAb-4461_bevacizumab_LC06	46	10

Ejemplo 7 (Referencia)

5 Inhibición de la unión de hVEGF al receptor hVEGF (ELISA)

La prueba se realizó en 384 placas de microtitulación (MicroCoat, Alemania, N° de Cat. 464.718) a TA. Después de cada incubación las placas se lavaron 3 veces con PBST. Al principio, las placas se recubrieron con 0,5 µg / ml de proteína hVEGF-R (R & D Systems, Reino Unido, N° de Cat. 321-FL) durante al menos 2 horas (h). A partir de entonces los pocillos se bloquearon con PBS suplementado con 0,2 % de Tween-20 y 2 % de BSA (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) durante 1 h. Las diluciones de los anticuerpos purificados en PBS se incubaron junto con 0,15 µg / ml huVEGF121 (R & D Systems, Reino Unido, N° de Cat. 298-VS) durante 1 h a TA. Después del lavado se añadió una mezcla de 0,5 µg / ml clon Mab923 anti-VEGF (R & D Systems, UK) y 1:2000 de F(ab')₂ anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (GE Healthcare, Reino Unido, N° de Cat. NA9310V) durante 1 h. Posteriormente, las placas se lavaron 6 veces con PBST. Las placas se revelaron con reactivo recién preparado de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Alemania, Tampón N° 204 530 001, tabletas N° 11 112 422 001) durante 30 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 405 nm .

Resumen de los datos del ELISA de interacción de VEGF:

20

anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2>	AVG CI50 (ng / ml)	DesvEst
	VEGF	
<VEGF-ANG-2> G6_31	1431	130
TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	1654	213
TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	1392	184
TvAb-2441bevacizumab_LC06	2831	503
TvAb-2441_bevacizumab_LC08	2305	972
TvAb-<ANG-2> Mab 536	> 20.000	
TvAb-<VEGF> Bevacizumab	1584	357
TvAb-3421_bevacizumab_LC06	2660	284
TvAb-4421_bevacizumab_LC06	1980	1319
TvAb-4461_bevacizumab_LC06	1677	394

Ejemplo 8 (Referencia)

25 Proliferación HUVEC

Con el fin de confirmar que las actividades relacionados anti-VEGF se retuvieron en los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <VEGFANG2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 se demostró que TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb -2441-bevacizumab-LC08 interfieren con la proliferación de HUVEC inducida por VEGF en una manera comparable como los clones madre LC06 y LC08 en el ensayo de proliferación de HUVEC inducida por VEGF como se describe anteriormente.

La figura 18 muestra que, efectivamente, TvAb-2441-bevacizumab-LC06 y TvAb-2441-bevacizumab-LC08 interfieren de una manera dependiente de la concentración con la proliferación de HUVEC inducida por VEGF comparable a la del anticuerpo parental bevacizumab.

35 Ejemplo 9 (Referencia)

Ensayo de unión ELISA a ANG-1 humano y a ANG-2 humano

La unión de los anticuerpos parentales <ANG-2>, Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 y Ang2k-LC08 a ANG-1 humana y ANG-2 humana se determinó en un ELISA de unión a ANG-1 o ANG-2 tal como se describió anteriormente (ver unión comparativa de ANG-1 y ANG-2 (ELISA de unión a ANG-1 y ANG-2)). Brevemente, el ensayo de tipo ELISA se basa en la inmovilización de Angiopoyetina-1 o 2 humana de tipo salvaje en una placa de microtitulación. La unión de un anticuerpo dirigido contra la ANG-1 o ANG-2 inmovilizada se mide a través de un anticuerpo <human Fc> (anti-IgG) con un conjugado POD. Una serie de diluciones del anticuerpo <ANG-2> permite determinar una concentración CE₅₀. Como referencia se utilizó el anticuerpo humano anti-ANG-2, anticuerpo <ANG-2> Mab536 (Oliner et al, Cancer Cell. Nov 2004; 6 (5):507-16, EE.UU. 2006 / 0122370). Las determinaciones de las concentraciones de CE₅₀ se resumen en la siguiente tabla.

Anticuerpo	unión a hANG-1 CE ₅₀	unión a hANG-2 CE ₅₀
<ANG-2> MAb536	2538 ng / ml	133 ng / mL
<ANG-2> Ang2i-LC06	> 8000 ng / mL	84 ng / mL
<ANG-2> Ang2i-LC07	> 8000 ng / mL	3006 ng / mL
<ANG-2> Ang2i-LC08	4044 ng / ml	105 ng / mL

Todos los anticuerpos se unen específicamente a ANG-2. Mab536 y Ang2k-LC08 muestran también una unión específica hacia ANG-1, mientras que Ang2i-LC06 y Ang2i-LC07 no se unen específicamente a ANG-1, ya que tienen un valor de CE₅₀ por encima de 8.000 ng / ml (límite de detección).

Ejemplo 10 (de referencia)

Expresión y purificación de moléculas de anticuerpo de cadena única tetravalentes biespecíficas, Fab <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-LC06-2620, scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640 y scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641

De forma análoga a los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 y en los materiales y métodos anteriores, las moléculas de anticuerpo de cadena única tetravalentes biespecíficas, Fab <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-LC06-2620, scFab-Avastin-LC06-2640 y scFab-Avastin-LC06-2641, los tres basados en <VEGF> bevacizumab y <ANG-2> Ang2i-LC06 se expresaron y purificaron. Las afinidades de unión y otras propiedades se determinaron como se describe en los ejemplos anteriores. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas relevantes (finalmente modificadas) de estos anticuerpos biespecíficos se proporcionan en el Id. de Sec. N°: 109 -110 (scFab-Avastin-LC06-2620), en el Id. de Sec. N°: 111 -112 (scFab-Avastin LC06-2640) y en el Id. de Sec. N°: 113-114 (scFab-Avastin-LC06-2641).

Datos clave	scFab-Avastin-LC06-2620	scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640	scFab-Avastin-LC06-Ang2i -2641
Expresión (Rendimiento)	29 µg/mL	27 µg / ml	18 µg / ml
Purificación (rendimiento, homog. de Prot. A)	21 mg, 57 %	19 mg, 86 %	12 mg, 90 %
Homogeneidad tras SEC preparativa	98 %	98 %	99 %
Función			
afinidad hANG-2 (Biacore)	1,9 E-9 M	1,8 E-9 M	1,9 E-9 M
afinidad hVEGF (Biacore)	1 E-10 M	1E -10 M	1E- 10 M

Ejemplo 11 (de referencia)

Expresión y purificación de molécula de anticuerpo biespecífica, trivalente de una sola cadena Fab <VEGF-ANG-2>, Avastin-LC06-KIH-scFab

De forma análoga a los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 y en los materiales y métodos anteriores, la molécula de anticuerpo biespecífica, trivalente de una sola cadena Fab <VEGF-ANG-2>, Avastin-LC06-KIH-C-scFab basada en <VEGF> bevacizumab y <ANG-2> Ang2i-LC06 se expresaron y se purificaron. Las afinidades de unión y otras propiedades se determinaron como se describe en los ejemplos anteriores. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas relevantes (finalmente modificadas) de este anticuerpo biespecífico se proporcionan en el Id. de Sec. N°: 115-117 (Avastin-LC06-KIH-C-scFab) .

Datos clave	Avastin-LC06-KIH-C-scFab
Expresión (Rendimiento)	15 µg/mL
Purificación (rendimiento, homog. de Prot. A)	4,8 mg, 91 %
Homogeneidad tras SEC preparativa	97 %
Función	
afinidad hANG-2 (Biacore)	4,4 E-9 M
afinidad hVEGF (Biacore)	1 E-10 M

Ejemplo 12 (de referencia)

Expresión y purificación de la molécula de anticuerpo biespecífico, trivalente <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-C-Fab-6CSS

5 De forma análoga a los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 y en los materiales y métodos anteriores (véase también, la molécula de anticuerpo biespecífico, trivalente <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-C-Fab-6CSS basada en <VEGF> bevacizumab y <ANG-2> Ang2i-LC06 se expresaron y purificaron. Las afinidades de unión y otras propiedades se determinaron como se describe en los ejemplos anteriores. Las moléculas de anticuerpo biespecíficos, trivalentes de este formato, en general, se describen en la solicitud EP N° 09005108.7. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas relevantes (finalmente modificadas) de estos anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> se proporcionan en el Id. de Sec. N°: 118-120 (Avastin-LC06-C-Fab-6CSS).

Datos clave	scFab-Avastin-LC06-2620	scFab-Avastin-LC06-2640	scFab-Avastin-LC06-2641
Expresión (Rendimiento)	29 µg/mL	27 µg / ml	18 µg / ml
Purificación (rendimiento, homog. de Prot. A)	21 mg, 57 %	19 mg, 86 %	12 mg, 90 %
Homogeneidad tras SEC preparativa	98 %	98 %	99 %
Función			
afinidad hANG-2 (Biacore)	1,9 E-9 M	1,8 E-9 M	1,9 E-9 M
afinidad hVEGF (Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

15 Ejemplo 13

Expresión y purificación de moléculas de anticuerpos biespecíficas, de dominio bivalente intercambiado <VEGF-ANG-2>, Avastin-LC06 -CH1-CL, Avastin-LC06-VH-VL y Avastin-LC06-VH-VL-SS

20 De forma análoga a los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 y en los materiales y métodos anteriores, las moléculas de anticuerpo biespecíficos, de dominio bivalente intercambiado <VEGF-ANG-2>, Avastin-LC06-CH1-CL (intercambio de CH-CL como se describe en el documento WO 2009 / 080253), Avastin-LC06-VH-VL (intercambio de VH-VL como se describe en el documento WO 2009 / 080252) y LC06 -VH-VL-SS-Avastin (intercambio de VH-VL como se describe en el documento WO 2009 / 080252 y un puente disulfuro adicional introducido en VH44 VL100) basado en <VEGF> bevacizumab y <ANG-2> Ang2i-LC06 se expresaron y purificaron. Las afinidades de unión y otras propiedades se determinaron como se describe en los los ejemplos anteriores. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas relevantes (finalmente modificadas) de estos anticuerpos biespecíficos se proporcionan en el Id. de Sec. N°: 121-124 (Avastin-LC06-CH1-CL), en el Id. de Sec. N°: 125-128 (Avastin-LC06-VH-VL) y en el Id. de Sec. N°: 129-132 (Avastin-LC06-VH-VL-SS).

Datos clave	Avastin-LC06-CM-CH1-CL	Avastin-LC06-CM-VH-VL	Avastin-LC06-VH-VL-SS
Expresión (Rendimiento)	87 µg/mL	44 µg / ml	65 µg / ml
Purificación (rendimiento, homog. de Prot. A)	50 mg, 62 %	22 mg, 95 %	91 mg, 74 %
Homogeneidad tras SEC preparativa	98 %	98 %	99 %
Función			
afinidad hANG-2 (Biacore)	1,3 E-9 M	2,1 E-9 M	1,46 E-9 M
afinidad hVEGF (Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

Ejemplo 14

35 Expresión y purificación de moléculas de anticuerpos de fusión scFab-Fc, biespecíficos, bivalentes <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-NscFab y Avastin-LC06 -N- scFabSS

40 De forma análoga a los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 y en los materiales y métodos anteriores, las moléculas de anticuerpos de fusión scFab-Fc, biespecíficos, bivalentes <VEGF-ANG-2>, Avastin-LC06-N-scFab y Avastin-LC06-N-scFabSS basadas en <VEGF> bevacizumab y <ANG-2> Ang2i-LC06 se expresaron y se purificaron. Las afinidades de unión y otras propiedades se determinaron como se describe en los ejemplos anteriores. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas relevantes de estos anticuerpos biespecíficos se proporcionan en el Id. de Sec. N°: 133-134 (Avastin-LC06-N-scFab), y en el Id. de Sec. N°: 135-136 (Avastin-LC06-N-scFabSS).

Datos clave	Avastin-LC06- N-scFab	Avastin-LC06- N-scFabSS
Expresión (Rendimiento)		62 µg / ml
Purificación (rendimiento, homog. de Prot. A)		43 %

Función		
afinidad hANG-2 (Biacore)		1 nM
afinidad hVEGF (Biacore)		1 nM

Ejemplo 15

5 Inhibición de la unión de hVEGF al receptor de hVEGF (ELISA), bloqueo de la formación de tubo inducida por VEGF, inhibición de la unión de huANG-2 a Tie-2 (ELISA), fosforilación de Tie2, y proliferación de HUVEC de las moléculas de anticuerpos biespecíficos, <VEGF-ANG-2> de los Ejemplos 10 a 14.

10 La inhibición de la unión de hVEGF al receptor de hVEGF (ELISA), el bloqueo de la formación de tubo inducida por VEGF, la inhibición de la unión de huANG-2 a Tie-2 (ELISA), la fosforilación de Tie2, y la proliferación de HUVEC de las moléculas de anticuerpos biespecíficos, <VEGF-ANG-2> de los Ejemplos 10 a 14 se pueden determinar de forma análoga a los procedimientos descritos en los Materiales y Métodos y en los Ejemplos 4 a 9 anteriores.

Ejemplo 16 (Referencia)

15 Eficacia in vivo del anticuerpo biespecifico <VEGF-ANG-2> en comparación con <ANG-2> ANG2i-LC06, y combinación de <ANG-2> ANG2i-LC06 y Avastin en el modelo refractario de xenoinjerto de Colo205 en ratones SCID de color beige (después de la resistencia al tratamiento con bevacizumab (Avastin))

20 Líneas celulares y condiciones de cultivo:

Las células de cáncer colorrectal humano Colo205 se obtuvieron originalmente de ATCC y después de la expansión se depositaron en el banco de células interna de Roche Penzberg. La línea celular tumoral se cultivó de forma rutinaria en RPMI 1640 (PAA, laboratories, Austria) se suplementó con 10 % de suero bovino fetal (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM, a 37 °C en una atmósfera saturada de agua en un 5% de CO₂. Se utilizaron de 2 a 5 pases para el trasplante.

Animales:

30 Ratones SCID hembra de color beige, con una edad de 4-5 semanas a la llegada (adquiridos de Charles River Alemania) se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 horas de luz / 12 h de oscuridad según las guías (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local. Después de la llegada de los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de las instalaciones de animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo del estado de su salud de manera regular. Alimentos (Provimi Kliba 3337) y agua (pH acidificado 2,5-3) se proporcionaron ad libitum. La edad de los ratones al inicio del estudio fue de aproximadamente 10 semanas.

Inyección de células tumorales:

40 El día de la inyección, se recogieron las células tumorales (tripsina-EDTA) de los matraces de cultivo (Greiner) y se transfirieron a 50 ml de medio de cultivo, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Después de un paso de lavado adicional con PBS y filtración (filtro de células; Falcon 0 100 µm) la concentración final de células se ajustó a $2,5 \times 10^7$ / ml. La suspensión de células tumorales se mezcló cuidadosamente con la pipeta de transferencia para evitar la agregación celular. Después de esto, la suspensión de células se introdujo en una jeringa de tuberculina de 45 1,0 ml (Braun Melsungen) mediante una aguja ancha (1,10 x 40 mm); para la inyección se cambió el tamaño de la aguja (0,45 x 25 mm) y para cada inyección se utilizó una aguja nueva. La anestesia se realizó utilizando una unidad de inhalación Stephens para pequeños animales con cámara de preincubación (plexiglás), máscara individual de nariz de ratón (de silicona) y compuesto de anestesia no inflamable o explosivo con isoflurano (CP-Pharma) en un sistema de circulación cerrado. Dos días antes de la inyección, se rasuró el pelo de los animales y para la inyección de células la piel de los animales anestesiados se levantó cuidadosamente con unas pinzas anatómicas y 100 µl de suspensión de células (= $2,5 \times 10^6$ células) se inyectó por vía subcutánea en el flanco derecho de los animales .

Tratamiento de animales

55 Pretratamiento:

El tratamiento de los animales comenzó 14 días después del trasplante de células (estudio Ang2_PZ_Colo205_008) a un volumen tumoral medio de 100 mm³ a 150 mm³, respectivamente. Los ratones se trataron una vez por semana con Avastin (10 mg / kg) durante un período de tiempo de 5 semanas .

60 Tratamiento secundario:

A partir de entonces los ratones se aleatorizaron para el segundo tratamiento y se dividieron en cuatro grupos con 10 ratones en cada grupo. El volumen del tumor al inicio del tratamiento secundario en el día 51 estaba en el rango de 336 a 341 mm³. Los ratones se trataron por vía intraperitoneal una vez por semana con los diferentes compuestos como se indica en la siguiente tabla.

5

Grupo	Nº de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg) (nMol/kg)	Ruta/Modo de administración	Nº de tratamientos	Dosis acumulada (mg/kg)
11	10	Avastin	10 mg/kg (68 nmol/kg)	i.p. una vez por semana	11	110
12	10	ANG2i-LC06	10 mg/kg (68 nmol/kg)	i.p. una vez por semana	6	60
13	10	ANG2i-LC06 + Avastin	10 mg/kg (68 nmol/kg) + 10 mg/kg (68 nmol/kg)	i.p. una vez por semana i.p. una vez por semana	6 11	60 110
14	10	TvAb-2441-bevacizumab-LC06	13 mg/kg (64 nmol/kg)	i.p. una vez por semana	6	78

Monitorización:

10 Los animales se controlaron 2 veces por semana por su estado de salud. Los pesos corporales se documentaron 2 veces por semana después de la inyección de células. Las dimensiones del tumor se midieron mediante pie de rey comenzando en el día de ensayo y posteriormente 2 veces por semana durante todo el período de tratamiento. El volumen del tumor se calculó de acuerdo con el protocolo del NCI (peso del tumor = 1/2ab², donde "a" y "b" son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente). Los criterios de terminación fueron la masa crítica del tumor (hasta 1,7 g o Ø > 1,5 cm), pérdida de peso corporal de más de 20 % del valor basal, ulceración del tumor o mal estado general de los animales .

15

Resultados: inhibición de crecimiento tumoral basado en las medianas (en porcentaje) en el día 91

	TGI
ANG2i-LC06 10 mg/kg (68 nMol/kg) i.p.; Avastin 10 mg / kg (68 nMol/kg) i.p.	45,3
ANG2i-LC06 10 mg/kg i.p. (68 nMol/kg)	44,4
TvAb-2441-bevacizumab-LC06 13mg/kg ip (64 nMol/kg)	60,4

20 Los resultados muestran que el anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2>, TvAb-2441-bevacizumab-LC06 mostró una mayor inhibición del crecimiento del tumor (en dosis más bajas) en el modelo Colo205 de xenoinjerto de tumor resistente a bevacizumab (Avastin) en ratones SCID de color beige en comparación con el tratamiento con anticuerpo mono-específico ANG2i-LC06 solo o la combinación de ANG2i-LC06 y Avastin.

25 Ejemplos 17 (Referencia)

Inhibición in vivo de la angiogénesis tumoral en xenotrasplante s.c. de Calu-3 NSCLC

30 -Detección no invasiva mediante imágenes in vivo de la angiogénesis utilizando anticuerpo anti-CD31 marcado

Líneas celulares y condiciones de cultivo:

35 Esta línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano se ha establecido a partir de un varón caucásico humano con cáncer de pulmón. Las células se obtuvieron de Roche, Kamakura y se hicieron pases de forma casera para trabajar el banco de células. Las células tumorales se cultivaron de forma rutinaria en medio RPMI1640 (PAN Biotech, Alemania) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (PAN Biotech, Alemania) y L-glutamina 2 mM (PAN Biotech, Alemania) a 37 °C en una atmósfera saturada de agua al 5 % de CO₂. El pase de cultivo se realizó con tripsina / EDTA 1x (PAN) dividiendo una vez / semana.

40 Animales:

45 Ratones Balb / c hembra desnudos, con una edad de 4-5 semanas a su llegada (adquiridos de Charles River Alemania) se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 horas de luz / 12 h de oscuridad según las guías (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local. Después de la llegada de los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de las instalaciones de animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo del estado de su salud de manera regular. Alimentos (Provimi Kliba 3337) y

agua (pH acidificado 2,5-3) se proporcionaron ad libitum. La edad de los ratones al inicio del estudio fue de aproximadamente 10 semanas.

Inyección de células tumorales:

5 El día de la inyección, se recogieron las células tumorales (tripsina-EDTA) de los matraces de cultivo (Greiner) y se transfirieron a 50 ml de medio de cultivo, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Después de un paso de lavado adicional con PBS y filtración (filtro de células; Falcon 0 100 μ m) la concentración final de células se ajustó a 5×10^7 / ml. La suspensión de células tumorales se mezcló cuidadosamente con la pipeta de transferencia para
10 evitar la agregación celular. Después de esto, la suspensión de células se introdujo en una jeringa de tuberculina de 1,0 ml (Braun Melsungen) mediante una aguja ancha (1,10 x 40 mm); para la inyección se cambió el tamaño de la aguja (0,45 x 25 mm) y para cada inyección se utilizó una aguja nueva. La anestesia se realizó utilizando una unidad de inhalación Stephens para pequeños animales con cámara de preincubación (plexiglás), máscara individual de nariz de ratón (de silicona) y compuesto de anestesia no inflamable o explosivo con isoflurano (CP-Pharma) en un sistema de circulación cerrado. Dos días antes de la inyección, se rasuró el pelo de los animales y para la inyección de células la piel de los animales anestesiados se levantó cuidadosamente con unas pinzas anatómicas y 100 μ l de suspensión de células ($=5 \times 10^6$ células) se inyectó por vía subcutánea en el flanco derecho de los animales .

Tratamiento de animales

20 En el día 35 del estudio, los ratones se asignaron al azar a grupos estadísticamente bien distribuidos, en función de su peso corporal y el tamaño del tumor. Para el tratamiento con anticuerpos terapéuticos, cada grupo constaba de 10 ratones y el tratamiento con anticuerpos terapéuticos se aplicó una vez por semana i.p. durante un período de tiempo de 6 semanas. (ver Fig. 19)

25 Grupo 1: vehículo (Xolair) 10 mg/kg
Grupo 2: Avastin 10 mg/kg
Grupo 3: Combinación de anticuerpo monoespecífico <VEGF> Avastin 10 mg/kg, más anticuerpo monoespecífico <ANG-2> Ang2i-LC06 10 mg/kg (= Avastin/Ang2i-LC06)
30 Grupo 4: anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2> 2441-Avastin-scFv-LC06 13,3 mg/kg

Monitorización:

35 Los animales se controlaron 2 veces por semana por su estado de salud. Los pesos corporales se documentaron 2 veces por semana después de la inyección de células. Las dimensiones del tumor se midieron mediante pie de rey comenzando en el día de ensayo y posteriormente 2 veces por semana durante todo el período de tratamiento. El volumen del tumor se calculó de acuerdo con el protocolo del NCI (peso del tumor = $1/2ab^2$, donde "a" y "b" son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente). Los criterios de terminación fueron la masa crítica del tumor (hasta 1,7 g o \varnothing > 1,5 cm), pérdida de peso corporal de más de 20 % del valor basal, ulceración del tumor o mal estado general de los animales .

Los vasos sanguíneos y la angiogénesis se monitorizaron con anticuerpo anti-CD 31 marcado.

45 Los estudios preliminares revelaron que el anticuerpo anti-CD31 es el mejor agente para el análisis por imágenes de la formación de vasculatura del tumor. Este agente se dirige a los receptores CD31 endoteliales de ratón y visualiza los vasos sanguíneos individuales con una baja relación señal- fondo. Por lo tanto, el análisis de imágenes con el anticuerpo anti-CD31 representa una forma viable de visualizar la vasculatura tumoral. Tres ratones de cada grupo de terapia se escogieron y se inyectaron i.v. con 50 μ g / ratón de anticuerpo anti-CD31 marcado de forma covalente con el fluoróforo orgánico Alexa610 en el día 35, 49 y 79. Se llevó a cabo un análisis de imágenes de infrarrojo cercano 24 horas después de cada aplicación del anticuerpo marcado bajo anestesia por inhalación. Un aumento o
50 disminución de la vasculatura del tumor se visualizó mediante el uso de la herramienta de comparación de imágenes del sistema MAESTRO. Se observó bajo el tratamiento con el mAAb de control Xolair y el anticuerpo terapéutico Avastin un aumento de los vasos sanguíneos del tumor desde el día 35 al día 79. Por otro lado, el tratamiento combinado con Avastin más Ang2i-LC06 y 2441-Avastin-scFv-LC06 presentó una disminución de la vasculatura del tumor (Fig. 19).

55 Las regiones tumorales se cuantificaron mediante la medición manual de las áreas y se analizaron las intensidades de señal en los valores de intensidad (señal total/ tiempo de exposición). Las tasas medias de variación de las señales de CD31 desde el día 35 al 49 y del día 49 al 79 se representan en la Fig. 19. Todos los grupos de tratamiento revelaron un aumento en la vasculatura del tumor desde el día 35 al 49. Si bien las señales tumorales CD31 aceleraron de manera constante en el grupo 1 (Xolair) y el grupo 2 (Avastin), la vasculatura del tumor se redujo significativamente en el grupo 3 (combinación de Avastin más <ANG-2> Ang2i-LC06) y el grupo 4 (anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2> 2441-Avastin-scFv-LC06), mostrando el grupo 4 claramente el efecto antiangiogénico más pronunciado (Fig. 19).

65

Inmediatamente después del último estudio de imagen in vivo, los tumores fueron explantados (día 79), fijados en formol e incluidos en parafina para estudios ex vivo. La microscopía de fluorescencia mostró numerosos capilares bien definidos en los tumores tratados con el mab control Xolair. Se observaron varios vasos sanguíneos del tumor en los ratones tratados con Avastin. Por contra, los grupos de tratamiento 3 y 4 tuvieron significativamente menos vasos sanguíneos y menos definidos en los tumores en comparación con los grupos el tratamiento 1 y 2 mientras que el grupo 4 mostró el efecto más pronunciado. El grupo 4 reveló una menor densidad de microvasos, los capilares fueron generalmente más pequeños y desestructurados y presentaron señales de fluorescencia anti-CD31 débiles como los grupos 1, 2 y 3. La tinción histoquímica con HE mostró regiones necróticas intratumorales en hasta un 90 % de todas las regiones en el grupo de tratamiento con el anticuerpo biespecífico del grupo 4 que es claramente superior a la de los otros grupos de tratamiento (datos no mostrados).

Ejemplo 18

Eficacia in vivo de los anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> y comparación con los anticuerpos monoespecíficos parentales (solos o en combinación) en el modelo de xenoinjerto subcutáneo por estadios de Colo205 en ratones SCID de color beige

Líneas celulares y condiciones de cultivo:

Las células cancerosas colorrectales humanas Colo205 se obtuvieron originalmente de ATCC y después de la expansión se depositaron en el banco de células interna Roche Penzberg. La línea celular tumoral se cultivó de forma rutinaria en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories, Austria) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM, a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5%. Se utilizaron de 2 a 5 pases para el trasplante.

Animales:

Ratones SCID hembra de color beige, con una edad de 4-5 semanas a la llegada (adquiridos de Charles River Alemania) se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 horas de luz / 12 h de oscuridad según las guías (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local. Después de la llegada de los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de las instalaciones de animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo del estado de su salud de manera regular. Alimentos (Provimi Kliba 3337) y agua (pH acidificado 2,5-3) se proporcionaron ad libitum. La edad de los ratones al inicio del estudio fue de aproximadamente 10 semanas.

Inyección de células tumorales:

En el día de la inyección se centrifugaron las células Colo205, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Después de un lavado adicional con PBS se determinó la concentración de células y el tamaño de las células utilizando un contador de células y un sistema analizador (VI-CELL, Beckman Coulter). Para la inyección de las células Colo205, la concentración final se ajustó a $5,0 \times 10^7$ células / ml, la viabilidad aprox. 90 %. Posteriormente, 100 µl de esta suspensión correspondiente a $2,5 \times 10^6$ células por animal se inyectó s.c. en el flanco derecho de los ratones.

El tratamiento de los animales comenzó en el día de la aleatorización, 16 días después del trasplante de células (estudio Ang2_PZ_Colo205_009) a un volumen tumoral medio de 100 mm³, respectivamente.

Calendario de dosis del estudio Ang2_PZ_Colo205_009:

Nº de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Ruta/Modo de administración
10	Xolair	10	i.p. una vez por semana
10	<VEGF> Avastin	10	i.p. una vez por semana
10	<ANG-2> Ang2i-LC06	10	i.p. una vez por semana
10	Ang2i-LC06 + Avastin	10 10	i.p. una vez por semana i.p. una vez por semana
10	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06	13,3	i.p. una vez por semana
10	<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL	20	i.p. una vez por semana
10	<VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-LC06-2620	16,6	i.p. una vez por semana

Monitorización:

Los animales se controlaron 2 veces por semana por su estado de salud. Los pesos corporales se documentaron 2 veces por semana después de la inyección de células. Las dimensiones del tumor se midieron mediante pie de rey comenzando en el día de ensayo y posteriormente 2 veces por semana durante todo el período de tratamiento. El volumen del tumor se calculó de acuerdo con el protocolo del NCI (peso del tumor = $1/2ab^2$, donde "a" y "b" son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente). Los criterios de terminación fueron la masa crítica del tumor (hasta 1,7 g o \varnothing > 1,5 cm), pérdida de peso corporal de más de 20 % del valor basal, ulceración del tumor o mal estado general de los animales.

Resultados:

Inhibición de crecimiento del tumor (TGI) basado en las medianas (en porcentaje) en el día 61

	TGI
<VEGF> Avastin	66
<ANG-2> Ang2i-LC06	47
Ang2i-LC06 + Avastin	78
<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06	87
<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CHI-CL	92
<VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-LC06-2620	86

Los resultados muestran que todos los tres anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2>, Avastin (bevacizumab)-ANG2i-LC06 (basados en las secuencias de bevacizumab Id. de Sec. N°: 7 y 8 y en las secuencias de ANG2i-LC06 Id. de Sec. N°: 52 y 53) mostraron una inhibición del crecimiento tumoral superior en el modelo de xenoinjerto de tumor Colo205 en ratones Scid de color beige en comparación con el tratamiento con anticuerpos mono-específicos ANG2i-LC06 y Avastin solos o la combinación de ANG2i-LC06 y Avastin.

Ejemplo 19

Expresión y purificación y propiedades de las moléculas de las moléculas de anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2>, scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 y scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC10-CHI-CL, Avastin-LC10-VH-VL y Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab y Avastin-LC10-N-scFabSS.

Mediante la sustitución de los dominios VH y VL de Ang2i-LC06 (Id. de Sec. N°: 52 y 53) con los correspondientes dominios VH y VL de Ang2i-LC10 (Id. de Sec. N°: 84 y 85) y el uso (aparte de dicha sustitución) de los procedimientos análogos y las secuencias descritas en los ejemplos 10 a 14, se expresaron y purificaron las moléculas de anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2>, scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 y scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-cFab-6CSS, Avastin-LC10-CHI-CL, Avastin-LC10-VH-VL y Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab y Avastin-LC10-N-scFabSS, todos ellos basados en <VEGF> bevacizumab y <ANG-2> Ang2i-LC10.

Las afinidades de unión y otras propiedades in vitro se determinaron como se describe en los ejemplos anteriores .

Ejemplo 20

Eficacia in vivo de las moléculas de anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2>, scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 y scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC10-CHI-CL, Avastin-LC10-VH-VL y Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab y Avastin-LC10-N-scFabSS.

La eficacia in vivo de las moléculas de anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2>, scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 y scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-C-KiH-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC10-CHI-CL, Avastin-LC10-VH-VL y Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab y Avastin-LC10-N-scFabSS se determinó de manera análoga a los correspondientes ejemplos anteriores.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-ANG-2

<130> 25401 FT

5 <150> PE 08017607.6 <151> 2008-10-08

<150> PE 08021834.0

<151> 2008-12-16

<160> 136

<170> PatentIn versión 3.2

10 <210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR3 de la cadena pesada, <VEGF>bevacizumab

<400> 1

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 2

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena pesada, <VEGF>bevacizumab

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
 1 5 10 15

25 Arg

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

ES 2 455 217 T3

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, <VEGF>bevacizumab

<400> 3

5

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> CDR3 de la cadena ligera, <VEGF>bevacizumab

<400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 5

15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, <VEGF>bevacizumab

20

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <VEGF>bevacizumab

<400> 6

ES 2 455 217 T3

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada, <VEGF>bevacizumab

<400> 7

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

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

10

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

ES 2 455 217 T3

<223> dominio variable de la cadena pesada, <VEGF>bevacizumab

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CDR3 de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab

<400> 9

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 10

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 455 217 T3

<223> CDR2 de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab

<400> 10

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

<210> 11

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab

10 <400> 11

His Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab

<400> 12

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

20 <210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> CDR2 de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab

<400> 13

ES 2 455 217 T3

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab

<400> 14

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

10 <210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> dominio variable de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab

<400> 15

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

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

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

ES 2 455 217 T3

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

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

<210> 16

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

10

50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

ES 2 455 217 T3

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 17

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> CDR2 de la cadena pesada, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 18

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, <VEGF>HuMab G6-31

20 <400> 19

Asp Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

ES 2 455 217 T3

<223> CDR3 de la cadena ligera, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 20

Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe Thr
1 5

<210> 21

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, <VEGF>HuMab G6-31

10 <400> 21

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

20 <210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> dominio variable de la cadena pesada, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 455 217 T3

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

<210> 24

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 24

ES 2 455 217 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Mab 536

<400> 25

10 Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr
1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Mab 536

ES 2 455 217 T3

<400> 26

Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Mab 536

<400> 27

Ser Tyr Gly Met His
1 5

10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Mab 536

<400> 28

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 29

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Mab 536

25 <400> 29

ES 2 455 217 T3

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Mab 536

<400> 30

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

10 <210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Mab 536

<400> 31

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

ES 2 455 217 T3

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> 32

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Mab 536

<400> 32

ES 2 455 217 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 Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> enlazante (G4S)4

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

10

<210> 34

<211> 104

<212> PRT

ES 2 455 217 T3

<213> Homo sapiens

<400> 34

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
20 25 30

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
35 40 45

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

5 <210> 35

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

ES 2 455 217 T3

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

ES 2 455 217 T3

	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								
				325					330								

<210> 36

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 36

ES 2 455 217 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

ES 2 455 217 T3

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 37

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

ES 2 455 217 T3

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> 38

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 38

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
 1 5

10

<210> 39

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

ES 2 455 217 T3

<400> 39

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 40

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 40

Asn Ala Trp Met Ser
1 5

10

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 41

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 42

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

25 <400> 42

ES 2 455 217 T3

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 43

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Arg Leu Asn
1 5 10

10 <210> 44

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 44

ES 2 455 217 T3

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Thr Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 45

ES 2 455 217 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Arg
20 25 30

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

Tyr His Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 46

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile
20

10 <210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 455 217 T3

<220>

<223> CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 47

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 . 5 10 15

Gly

5 <210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 48

Gly Tyr Tyr Met His
1 . 5

<210> 49

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 49

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val
1 5 10

20

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06

ES 2 455 217 T3

<400> 50

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 51

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 51

10 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 52

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 52

ES 2 455 217 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 53

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 53

ES 2 455 217 T3

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp 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 Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 54

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 54

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile
20

10

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 455 217 T3

<220>

<223> CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 55

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 . 5 10 15

Gly

5 <210> 56

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 56

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 57

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 57

Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Gln Gly Val

20

1

5

10

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

ES 2 455 217 T3

<223> CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 58

Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 59

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07

10 <400> 59

Gly Gly Asn Phe Ile Gly Gly Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 60

<211> 129

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 60

ES 2 455 217 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 61

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 61

ES 2 455 217 T3

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

Thr Ala Arg Val Ala Cys Gly Gly Asn Phe Ile Gly Gly Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Ile Ile Thr Arg Ala Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Gln
85 90 95

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 62

Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

10 <210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 63

ES 2 455 217 T3

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 64

Ser Tyr Gly Met His
1 5

10 <210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2k-LC08

<400> 65

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

<210> 66

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 66

Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

25

ES 2 455 217 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val 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
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 Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 69

ES 2 455 217 T3

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 70

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
 1 5

10 <210> 71

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09

ES 2 455 217 T3

<400> 71

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 72

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 72

Asn Ala Trp Met Ser
1 5

10

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 73

Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro
1 5

<210> 74

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09

25 <400> 74

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 75

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

10 <210> 76

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 76

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Thr Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Ser Pro Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 77

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 77

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

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr
 100 105

10

<210> 78

<211> 20

ES 2 455 217 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10

5 <400> 78

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile
20

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 79

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

15 <210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> CDR1 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 80

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 81

ES 2 455 217 T3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> CDR3 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 81

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
1 5 10

<210> 82

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 82

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

15

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 83

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 84

25 <211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 455 217 T3

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

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 86

Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

10 <210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR2 de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 87

ES 2 455 217 T3

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 91

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10

10 <210> 92

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> dominio variable de la cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val 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

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

ES 2 455 217 T3

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

Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

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

<210> 93

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11

<220>

<221> característica misc.

10 <222> (98)..(98)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica misc.

<222> (102)..(102)

15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 93

Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr
1 5 10 15

Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln
20 25 30

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

ES 2 455 217 T3

Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr
50 55 60

Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr
65 70 75 80

Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Gly Val Phe Gly
85 90 95

Gly Xaa Thr Lys Leu Xaa Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, <VEGF>B20-4.1

<400> 94

Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR2 de la cadena pesada, <VEGF>B20-4.1

<400> 95

Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 96

<211> 8

ES 2 455 217 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, <VEGF>B20-4.1

5 <400> 96

Phe Ser Ile Asn Gly Ser Trp Ile
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena ligera, <VEGF>B20-4.1

<400> 97

Gln Gln Ser Asn Thr Ser Pro Leu Thr
1 5

15 <210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> CDR2 de la cadena ligera, <VEGF>B20-4.1

<400> 98

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 99

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, <VEGF>B20-4.1

ES 2 455 217 T3

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Val Ile Arg Arg Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 100

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada, <VEGF>B20-4.1

<400> 100

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Asn Gly Ser
20 25 30

Trp Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val
115

10

<210> 101

<211> 108

<212> PRT

ES 2 455 217 T3

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <VEGF>B20-4.1

<400> 101

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Arg Arg Ser
20 25 30

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

5

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

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

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

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

<210> 102

<211> 730

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de fusión de scFv y cadena pesada de bevacizumab Ang2i_LC06 de <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06

<400> 102

ES 2 455 217 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

ES 2 455 217 T3

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
 465 470 475 480

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
 485 490 495

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln
 500 505 510

Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser
 515 520 525

Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr
 530 535 540

Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg
 545 550 555 560

Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr
 565 570 575

Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp
 580 585 590

ES 2 455 217 T3

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro
610 615 620

Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
625 630 635 640

Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp
645 650 655

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp
660 665 670

Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
675 680 685

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
690 695 700

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val
705 710 715 720

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
725 730

<210> 103

<211> 727

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de fusión de scFv y cadena pesada de bevacizumab Ang2i_LC08 de <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC08

10 <400> 103

ES 2 455 217 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

ES 2 455 217 T3

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

ES 2 455 217 T3

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
 465 470 475 480

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 485 490 495

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln
 500 505 510

Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly
 515 520 525

Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 530 535 540

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 545 550 555 560

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile
 565 570 575

Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 580 585 590

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro
 610 615 620

ES 2 455 217 T3

Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser
625 630 635 640

Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln
645 650 655

Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg
660 665 670

Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser
675 680 685

Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
690 695 700

Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Cys
705 710 715 720

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
725

<210> 104

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera de bevacizumab

<400> 104

ES 2 455 217 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 105

<211> 191

<212> PRT

ES 2 455 217 T3

<213> Homo sapiens

<400> 105

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
 130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
 145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
 165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg

180

185

190

<210> 106

ES 2 455 217 T3

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Angiopoietina-2 humana (ANG-2) con secuencia líder y cola de His

<400> 106

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro
35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala
50 55 60

Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu
65 70 75 80

Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys
85 90 95

Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile
100 105 110

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly
115 120 125

Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp
130 135 140

Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu
145 150 155 160

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp
165 170 175

ES 2 455 217 T3

Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
180 185 190

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

Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
210 215 220

Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
225 230 235 240

Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
245 250 255

Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
260 265 270

Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
275 280 285

Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn
290 295 300

Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly
305 310 315 320

Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
325 330 335

Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
340 345 350

Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg
355 360 365

Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
370 375 380

Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
385 390 395 400

Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile

ES 2 455 217 T3

Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp
85 90 95

Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met
100 105 110

Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu
115 120 125

Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys
130 135 140

Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu
145 150 155 160

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln
165 170 175

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser
180 185 190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu
195 200 205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr
210 215 220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala
225 230 235 240

Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp
245 250 255

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu
260 265 270

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
275 280 285

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
290 295 300

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn

ES 2 455 217 T3

Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu
20 25 30

Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly
35 40 45

Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu
50 55 60

Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
65 70 75 80

Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile
85 90 95

Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg
100 105 110

Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr
115 120 125

Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys
130 135 140

Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
145 150 155 160

Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val
165 170 175

His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg
180 185 190

Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val
195 200 205

Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys
210 215 220

ES 2 455 217 T3

Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
 225 230 235 240
 Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu
 245 250 255
 Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu
 260 265 270
 Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser
 275 280 285
 Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro
 290 295 300
 Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln
 325 330 335
 Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile
 340 345 350
 Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro
 355 360 365
 Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr
 370 375 380
 Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His
 385 390 395 400
 Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro
 405 410 415
 Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met
 420 425 430
 Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu
 435 440 445
 Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn

ES 2 455 217 T3

Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro
690 695 700

Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser
705 710 715 720

Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln
725 730 735

Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu
740 745 750

Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile
755 760 765

Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala
770 775 780

Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr
785 790 795 800

Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr
805 810 815

Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu
820 825 830

Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu
835 840 845

Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp
850 855 860

Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly
865 870 875 880

His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly
885 890 895

Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp
900 905 910

Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile
 915 920 925

Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe
 930 935 940

Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe
 945 950 955 960

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr
 965 970 975

Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr
 980 985 990

Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu
 995 1000 1005

Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser
 1010 1015 1020

Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro
 1025 1030 1035

Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln
 1040 1045 1050

Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr
 1055 1060 1065

Asp Leu Met Arg Gln Cys Trp Arg Glu Lys Pro Tyr Glu Arg Pro
 1070 1075 1080

Ser Phe Ala Gln Ile Leu Val Ser Leu Asn Arg Met Leu Glu Glu
 1085 1090 1095

Arg Lys Thr Tyr Val Asn Thr Thr Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Tyr
 1100 1105 1110

Ala Gly Ile Asp Cys Ser Ala Glu Glu Ala Ala
 1115 1120

ES 2 455 217 T3

<210> 109

<211> 946

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo scFab tetravalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-LC06-2620

<400> 109

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

ES 2 455 217 T3

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

ES 2 455 217 T3

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 450 455 460

Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr
 465 470 475 480

Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 485 490 495

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp
 500 505 510

Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn
 515 520 525

Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp
 530 535 540

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr
 545 550 555 560

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala
 565 570 575

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 580 585 590

ES 2 455 217 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
595 600 605

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
610 615 620

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
625 630 635 640

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
645 650 655

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
660 665 670

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
705 710 715 720

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
725 730 735

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
740 745 750

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
755 760 765

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
770 775 780

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
785 790 795 800

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp
805 810 815

Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
820 825 830

ES 2 455 217 T3

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
835 840 845

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
850 855 860

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
865 870 875 880

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
885 890 895

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
900 905 910

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
915 920 925

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
930 935 940

Thr His
945

<210> 110

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de la molécula de anticuerpo scFab tetravalente, biespecifico <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-LC06-2620

10 <400> 110

ES 2 455 217 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 111

<211> 956

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo scFab tetravalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640

<400> 111

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

10

ES 2 455 217 T3

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

ES 2 455 217 T3

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

ES 2 455 217 T3

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro
 465 470 475 480

Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
 485 490 495

Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 500 505 510

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 515 520 525

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 530 535 540

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr
 565 570 575

Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 580 585 590

ES 2 455 217 T3

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 595 600 605

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 610 615 620

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 625 630 635 640

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 645 650 655

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 660 665 670

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 705 710 715 720

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 725 730 735

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 740 745 750

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 755 760 765

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 770 775 780

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 785 790 795 800

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 805 810 815

ES 2 455 217 T3

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 820 825 830

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 835 840 845

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 850 855 860

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 865 870 875 880

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 885 890 895

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 900 905 910

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 915 920 925

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 930 935 940

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 945 950 955

<210> 112

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de la molécula de anticuerpo scFab tetravalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640

<400> 112

ES 2 455 217 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

ES 2 455 217 T3

<210> 113

<211> 956

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo scFab tetravalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641

<400> 113

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro
 465 470 475 480
 Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
 485 490 495
 Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 500 505 510
 Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 515 520 525
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 530 535 540
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr
 565 570 575
 Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 580 585 590
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 595 600 605

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 610 615 620

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 625 630 635 640

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 645 650 655

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 660 665 670

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 705 710 715 720

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 725 730 735

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 740 745 750

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met
 755 760 765

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 770 775 780

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 785 790 795 800

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 805 810 815

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 820 825 830

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 835 840 845

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 850 855 860

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 865 870 875 880

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 885 890 895

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 900 905 910

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 915 920 925

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 930 935 940

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 945 950 955

<210> 114

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de la molécula de anticuerpo scFab tetravalente, biespecifico <VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641

<400> 114

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

10

ES 2 455 217 T3

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 115

<211> 946

5 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 455 217 T3

<220>

<223> Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo scFab trivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-KiHC-scFab

<400> 115

5

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

ES 2 455 217 T3

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 450 455 460
 Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr
 465 470 475 480
 Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 485 490 495
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp
 500 505 510
 Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn
 515 520 525
 Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp
 530 535 540
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr
 545 550 555 560
 Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala
 565 570 575
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 580 585 590
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 595 600 605

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 610 615 620
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 625 630 635 640
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 645 650 655
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 660 665 670
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 675 680 685
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
 705 710 715 720
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 725 730 735
 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 740 745 750
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 755 760 765
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 770 775 780
 Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
 785 790 795 800
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp
 805 810 815

ES 2 455 217 T3

Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
820 825 830

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
835 840 845

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
850 855 860

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
865 870 875 880

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
885 890 895

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
900 905 910

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
915 920 925

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
930 935 940

Thr His
945

<210> 116

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo scFab trivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-KiHC-scFab

<400> 116

ES 2 455 217 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

ES 2 455 217 T3

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 117

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de la molécula de anticuerpo scFab trivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-KiH-CscFab

<400> 117

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

ES 2 455 217 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

ES 2 455 217 T3

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

ES 2 455 217 T3

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala
 485 490 495

Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser
 500 505 510

Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
 515 520 525

Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
 530 535 540

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val
 545 550 555 560

Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser
 565 570 575

Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg
 580 585 590

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 595 600 605

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 610 615 620

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 625 630 635 640

ES 2 455 217 T3

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
645 650 655

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
660 665 670

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
675 680 685

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690 695

<210> 119

<211> 719

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo trivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-C-Fab-6CSS

<400> 119

ES 2 455 217 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

ES 2 455 217 T3

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

ES 2 455 217 T3

450						455											460
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly		
465					470					475							480
Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys		
				485					490					495			
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe		
			500					505					510				
Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu		
		515					520					525					
Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala		
	530					535					540						
Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser		
545					550					555					560		
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val		
				565					570					575			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly		
			580					585					590				
Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val		
		595					600					605					
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala		
	610					615					620						
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu		
625					630					635					640		
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly		
				645					650					655			
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser		
			660					665					670				
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu		
		675					680					685					

ES 2 455 217 T3

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 690 695 700

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 705 710 715

<210> 120

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de la molécula de anticuerpo trivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-C-Fab-6CSS

<400> 120

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

ES 2 455 217 T3

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 121

<211> 459

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 1 de dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecifico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL

<400> 121

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

10

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

ES 2 455 217 T3

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 122

<211> 457

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL

ES 2 455 217 T3

<400> 122

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

ES 2 455 217 T3

50						55						60				
Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	
			100					105						110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	
		115					120						125			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
	130					135					140					
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
145					150					155					160	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
				165					170						175	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
			180					185						190		
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
		195					200					205				

ES 2 455 217 T3

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 210 215 220

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285

ES 2 455 217 T3

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 405 410 415

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 123

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 1 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL

ES 2 455 217 T3

<400> 123

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp 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 Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

ES 2 455 217 T3

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 124

<211> 212

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 2 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecifico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL

<400> 124

ES 2 455 217 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205

Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 125

ES 2 455 217 T3

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Cadena pesada 1 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL

<400> 125

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
130 135 140

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

ES 2 455 217 T3

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 126

<211> 439

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL

<400> 126

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

10

ES 2 455 217 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

ES 2 455 217 T3

				325						330						335
Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	
			340					345					350			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
		355					360					365				
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
	370					375					380					
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	
385					390					395					400	
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
				405					410					415		
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
			420					425					430			
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
		435														

<210> 127

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 1 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL

<400> 127

ES 2 455 217 T3

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp 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 Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

ES 2 455 217 T3

<210> 128

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cadena ligera 2 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecifico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL

<400> 128

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 130 135 140

10

ES 2 455 217 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
195 200 205

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
210 215 220

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 129

<211> 459

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 1 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL-SS

<400> 129

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

ES 2 455 217 T3

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
130 135 140

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

ES 2 455 217 T3

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300

ES 2 455 217 T3

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 130

<211> 439

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL-SS

10 <400> 130

ES 2 455 217 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140

ES 2 455 217 T3

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365

ES 2 455 217 T3

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 131

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 1 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecifico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL-SS

<400> 131

ES 2 455 217 T3

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

ES 2 455 217 T3

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 132

<211> 230

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 2 del dominio intercambiado de la molécula de anticuerpo bivalente, biespecífico <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-VH-VL-SS

<400> 132

ES 2 455 217 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 195 200 205

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 210 215 220

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 133

<211> 706

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc bivalente, biespecífica <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-NscFab

<400> 133

10 Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

ES 2 455 217 T3

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp 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 Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
 245 250 255

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 260 265 270

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 275 280 285

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly
 290 295 300

Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
 305 310 315 320

Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp
 325 330 335

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr
 340 345 350

Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 355 360 365

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 370 375 380

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 385 390 395 400

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 405 410 415

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 420 425 430

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 435 440 445

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 450 455 460

ES 2 455 217 T3

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
465 470 475 480

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
485 490 495

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
500 505 510

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
515 520 525

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
530 535 540

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
545 550 555 560

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
565 570 575

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
580 585 590

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
595 600 605

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
610 615 620

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
625 630 635 640

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
645 650 655

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
660 665 670

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
675 680 685

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

ES 2 455 217 T3

690

695

700

Gly Lys

705

<210> 134

<211> 699

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc bivalente, biespecífica <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-NscFab

<400> 134

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

10

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 245 250 255
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 260 265 270
 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 275 280 285
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
 290 295 300
 Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
 305 310 315 320
 Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 325 330 335
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser
 340 345 350

ES 2 455 217 T3

His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 355 360 365

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 370 375 380

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 385 390 395 400

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 405 410 415

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 420 425 430

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 435 440 445

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 450 455 460

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 465 470 475 480

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 485 490 495

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 500 505 510

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 515 520 525

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 530 535 540

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 545 550 555 560

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 565 570 575

ES 2 455 217 T3

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
580 585 590

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
595 600 605

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
645 650 655

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210> 135

<211> 706

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 1 de la molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc bivalente, biespecífica <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-NscFabSS

10 <400> 135

ES 2 455 217 T3

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp 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 Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

ES 2 455 217 T3

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
 245 250 255

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 260 265 270

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 275 280 285

Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly
 290 295 300

Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
 305 310 315 320

Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp
 325 330 335

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr
 340 345 350

Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 355 360 365

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 370 375 380

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 385 390 395 400

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 405 410 415

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 420 425 430

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 435 440 445
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 450 455 460
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 465 470 475 480
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 485 490 495
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 500 505 510
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 515 520 525
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 530 535 540
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 545 550 555 560
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 565 570 575
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 580 585 590
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 595 600 605
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 610 615 620
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 625 630 635 640

ES 2 455 217 T3

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
645 650 655

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
660 665 670

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
675 680 685

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
690 695 700

Gly Lys
705

<210> 136

<211> 699

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 de la molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc bivalente, biespecífica <VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-NscFabSS

<400> 136

10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

ES 2 455 217 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240

ES 2 455 217 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 245 250 255

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 260 265 270

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 275 280 285

Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
 290 295 300

Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
 305 310 315 320

Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 325 330 335

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser
 340 345 350

His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 355 360 365

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 370 375 380

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 385 390 395 400

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 405 410 415

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 420 425 430

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 435 440 445

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 450 455 460

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF) y la angiopoyetina-2 humana (ANG-2), que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente al VEGF humano y un segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a la ANG-2 humana, en el que i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de ellos un par de dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo y dominio variable de cadena ligera de anticuerpo; ii) dicho primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente al VEGF comprende en el dominio variable de la cadena pesada, una región CDR3 de Id. de Sec. N° 1, una región CDR2 de Id. de Sec. N° 2, y una región CDR1 de Id. de Sec. N° 3, y en el dominio variable de la cadena ligera, una región CDR3 de Id. de Sec. N° 4, una región CDR2 de Id. de Sec. N° 5, y una región CDR1 de Id. de Sec. N° 6; iii) dicho segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a ANG-2 comprende en el dominio variable de la cadena de de cadena pesada, una región CDR3 de Id. de Sec. N° 46, una región CDR2 de Id. de Sec. N° 47, y una región CDR1 de Id. de Sec. N° 48, y en el dominio variable de cadena ligera, una región CDR3 de Id. de Sec. N° 49, una región CDR2 de Id. de Sec. N° 50, y una región CDR1 de Id. de Sec. N° 51; y iv) dicho anticuerpo es bivalente.
- 20 2. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque la relación de las afinidades de unión Kd del sitio de unión al antígeno específico para VEGF/ Kd del sitio de unión a antígeno específico para ANG-2 es de 1,0 a 10,0.
- 25 3. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 2, que se caracteriza porque el segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a la ANG-2 humana no se une específicamente a la angiopoyetina humana 1 (ANG-1).
- 30 4. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3.
- 35 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 40 6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares.
- 45 7. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 50 8. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3 para su utilización en el tratamiento de enfermedades vasculares.
9. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3.
10. Un vector de expresión que contiene el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10 capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped procarionta o eucariota.
11. Una célula huésped procarionta o eucariota que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Un método para la producción de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, caracterizado por expresar un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 en una célula huésped procarionta o eucariota y la recuperación de dicho anticuerpo biespecífico a partir de dicha célula o del sobrenadante de su cultivo celular.

Figura 1A

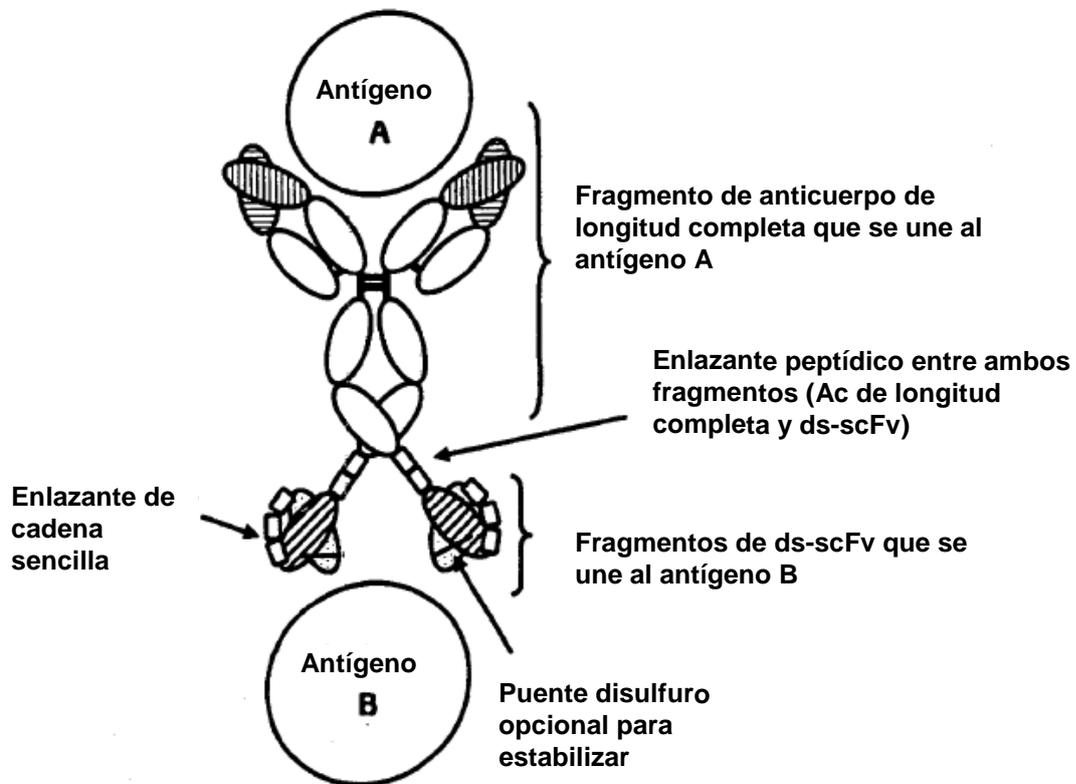


Figura 1B

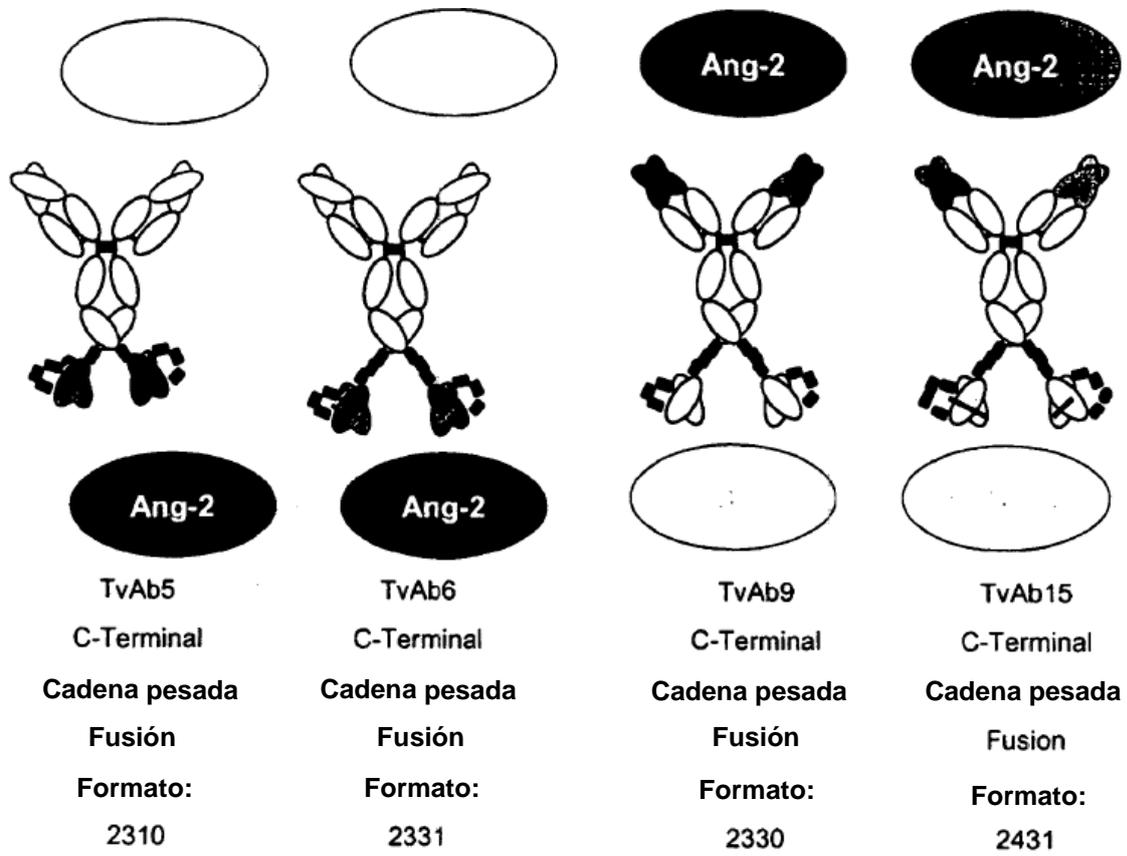


Figura 2A

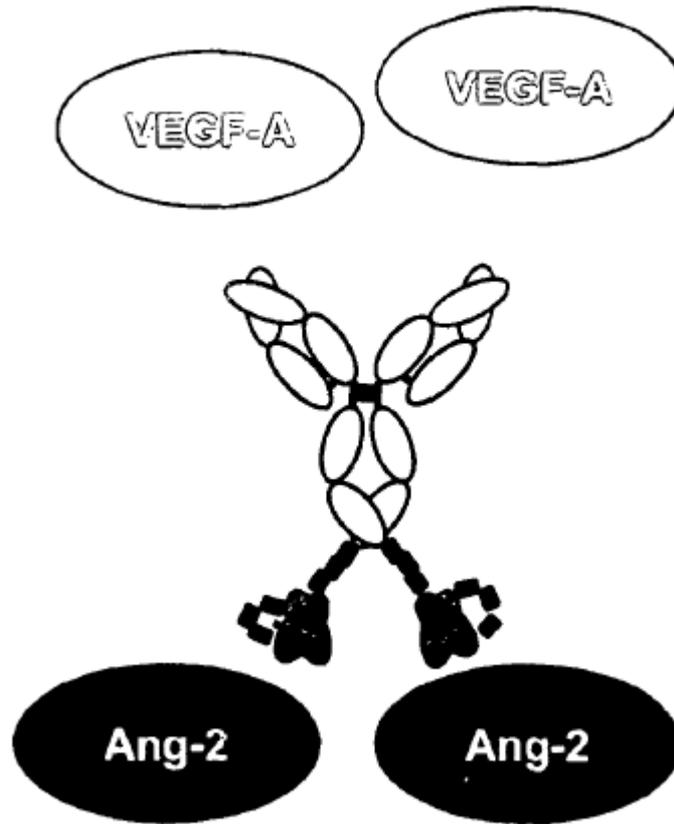


Figura 2-parte uno

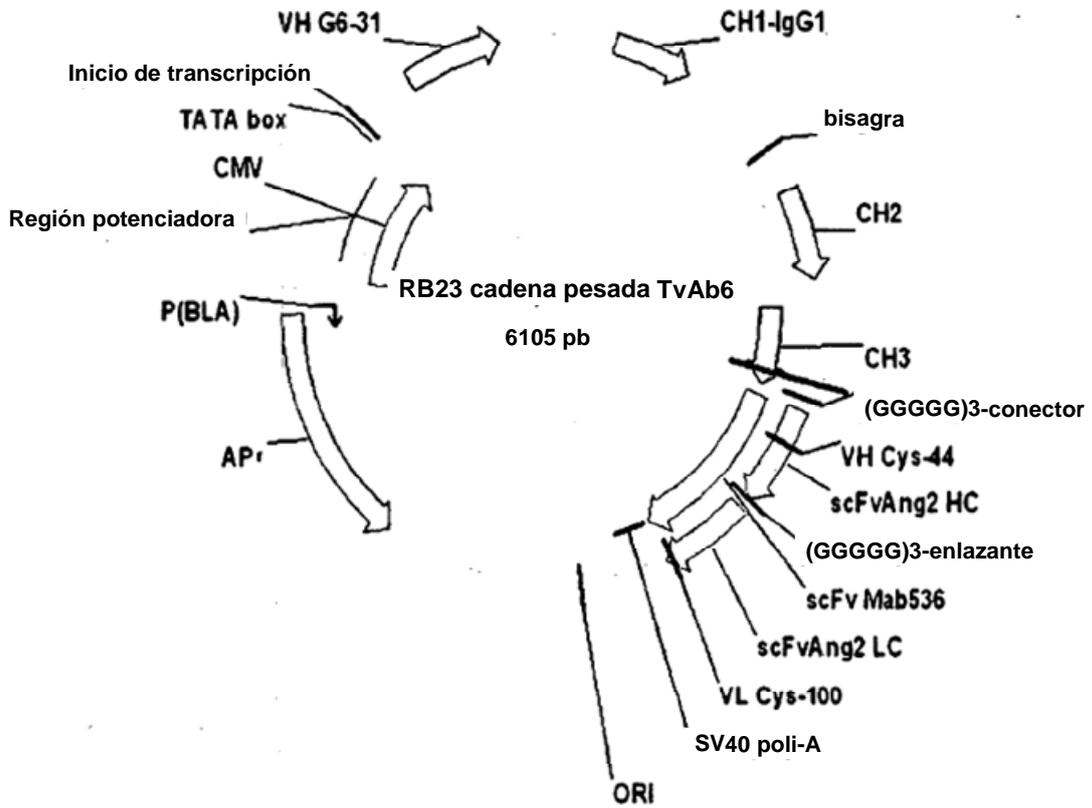


Figura 2b-parte dos

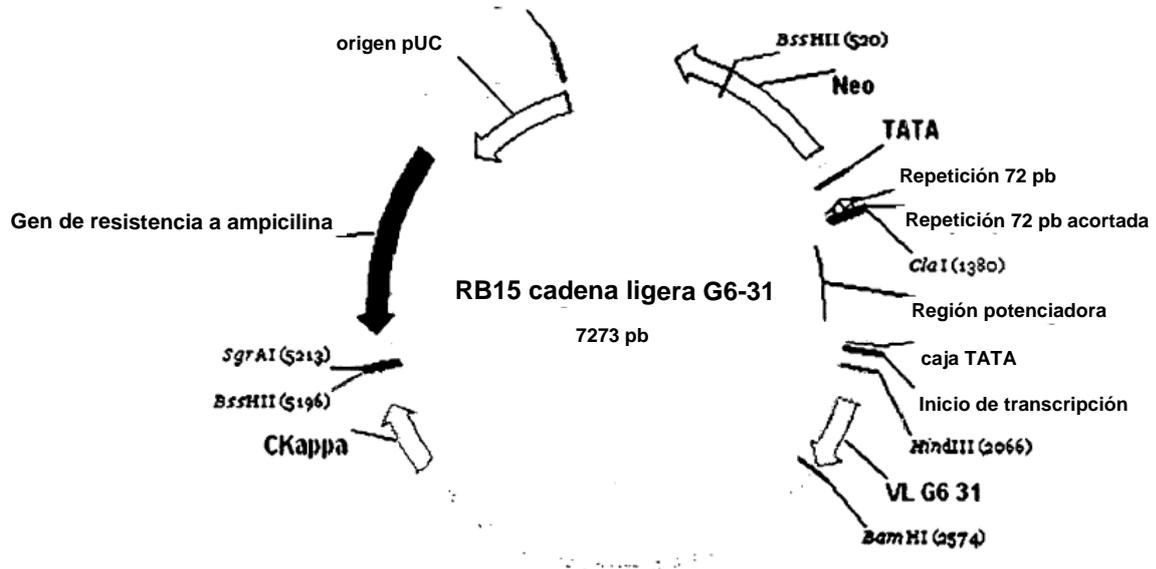


Figura 3

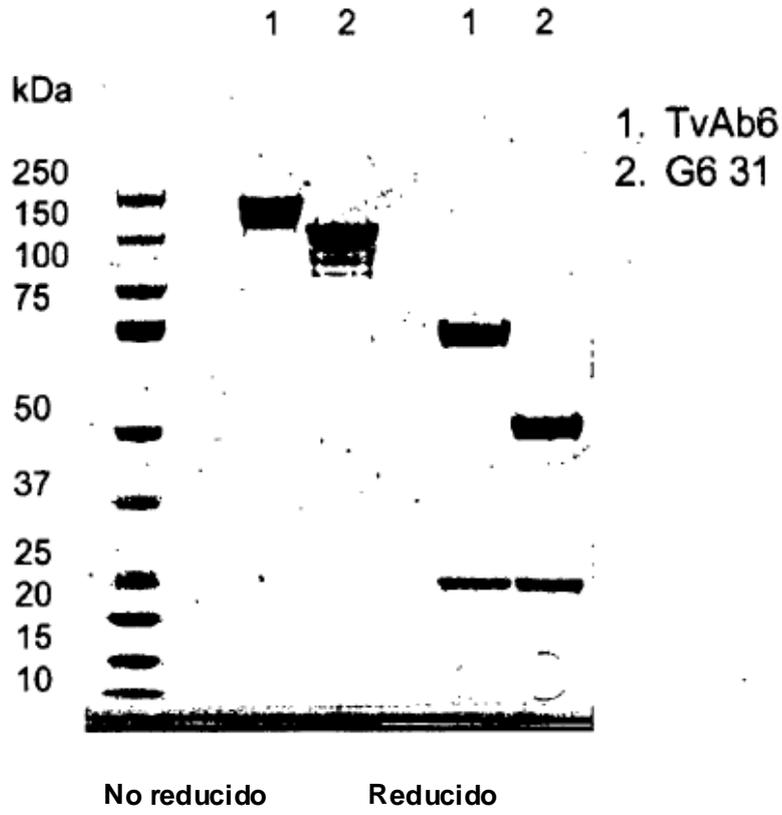


Figura 4A

1. Conjunto de proteína A
G6-31: 10% de agregados
TVAb6: 25% de agregados

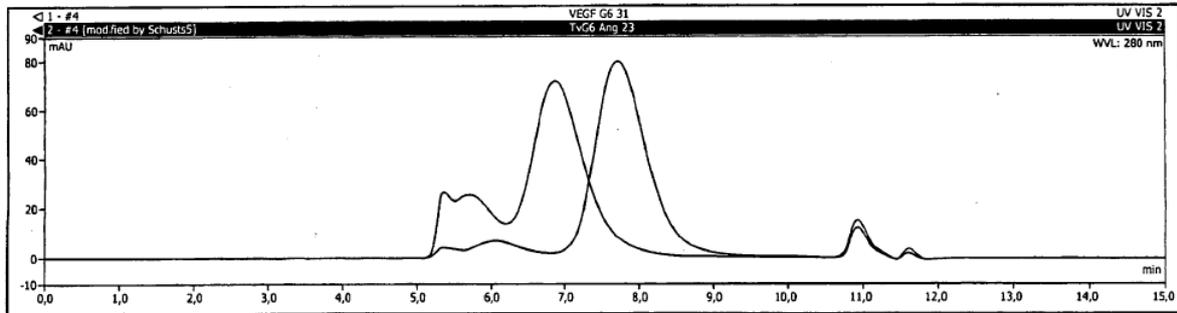


Figura 4B

1. Conjunto de SEC, tras purificación
G6-31: >99% monómero
TVAb6: >99% monómero

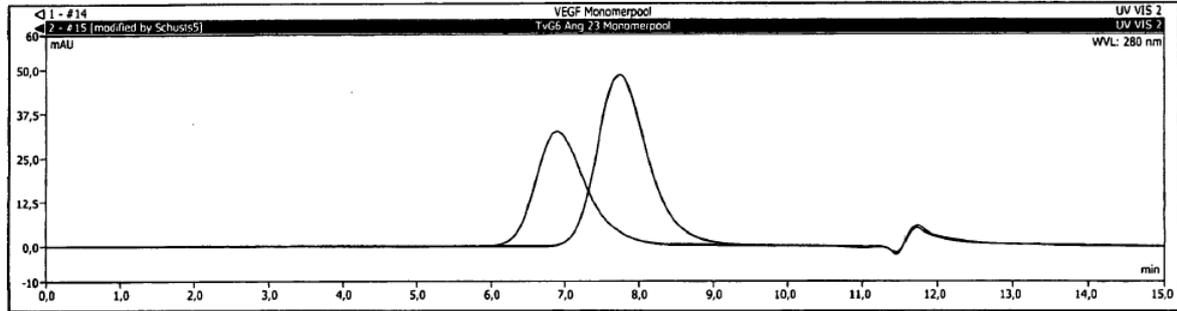


Figura 4C

3. Conjunto de SEC, tras 24h a 4°C
G6-31: >99% monómero
TVAb6: >99% monómero

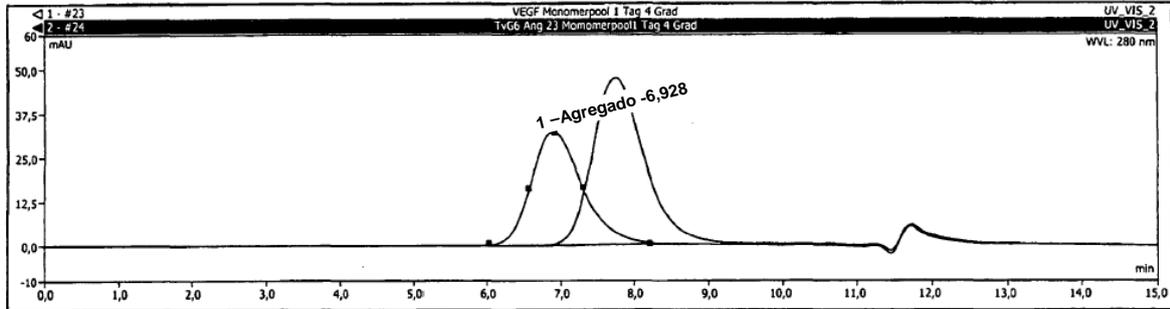


Figura 5-parte uno

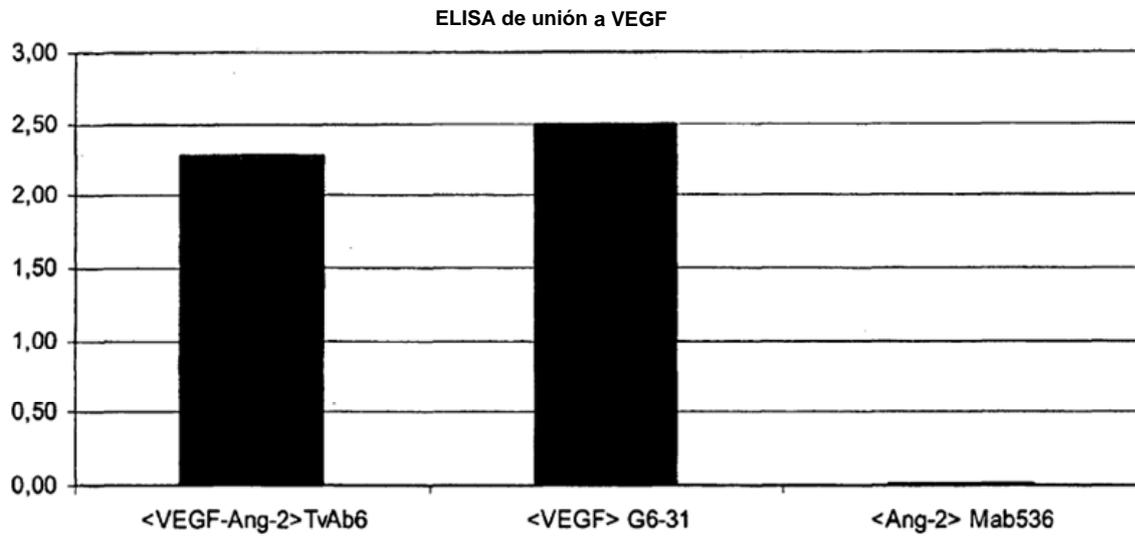


Figura 5-parte dos

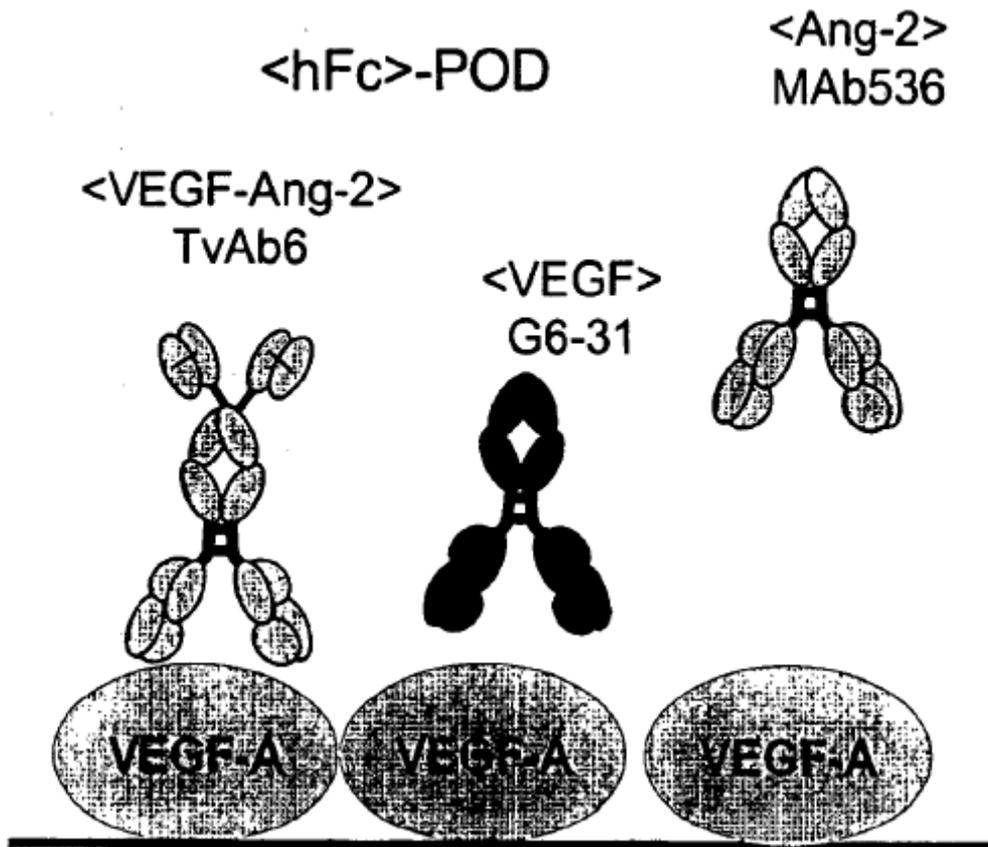
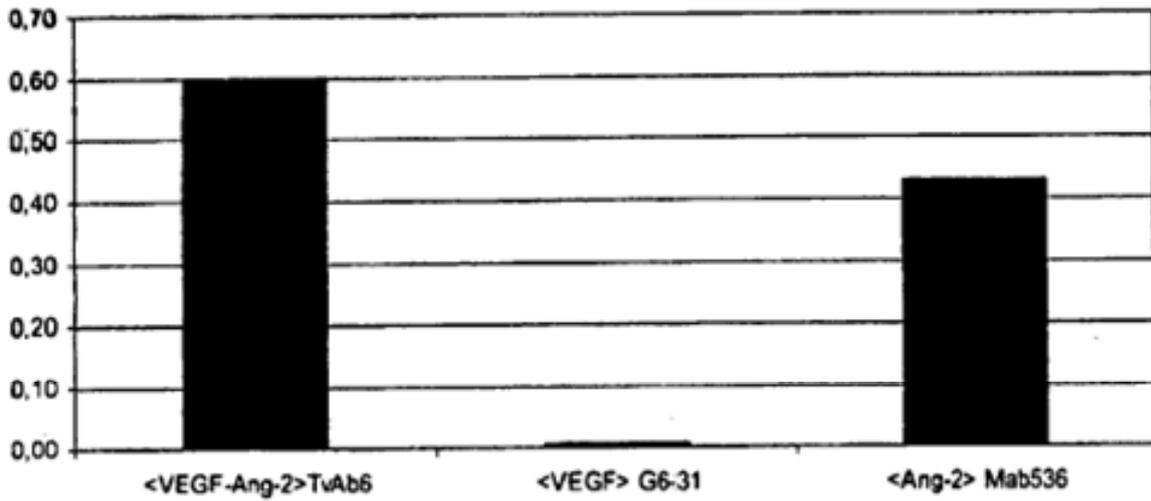


Figura 6A

ELISA de unión a Ang-2



<hk>-POD

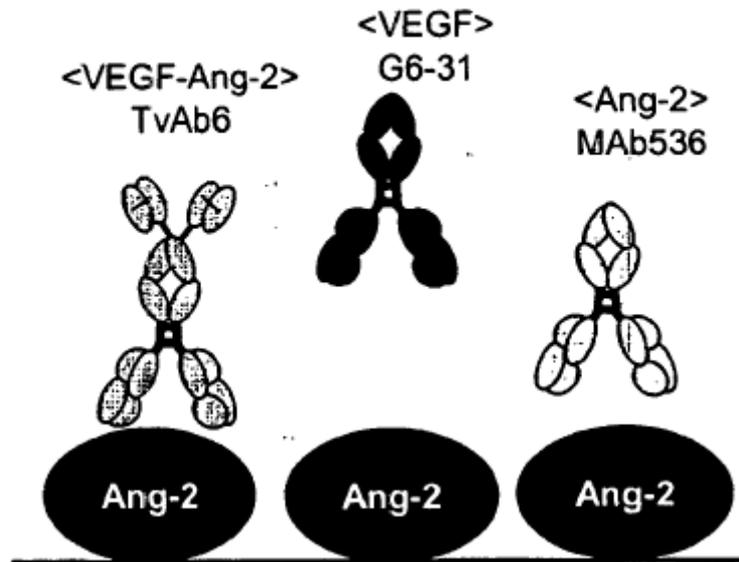
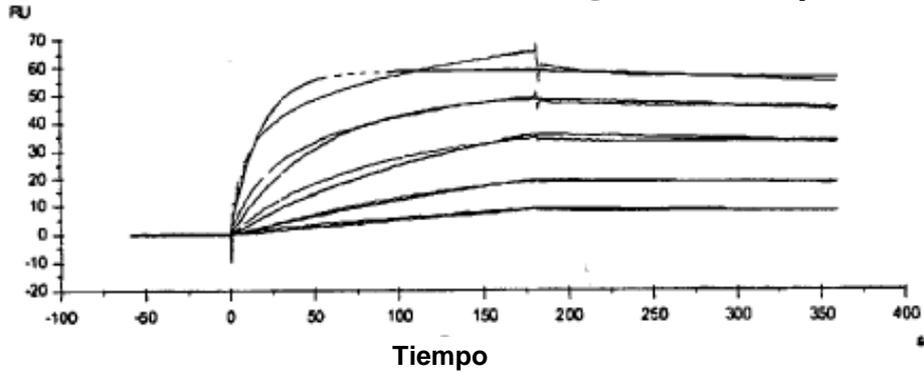


Figura 6B

Unión de hAng-2 a <Ang-2> Mab536 (Modelo de unión de Langmuir 1:1)



Unión de hAng-2 a <VEGF-Ang-2> TvAb6

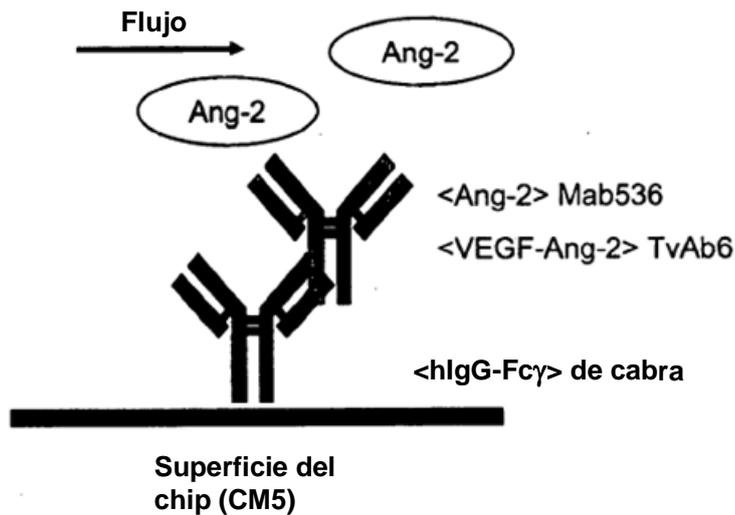
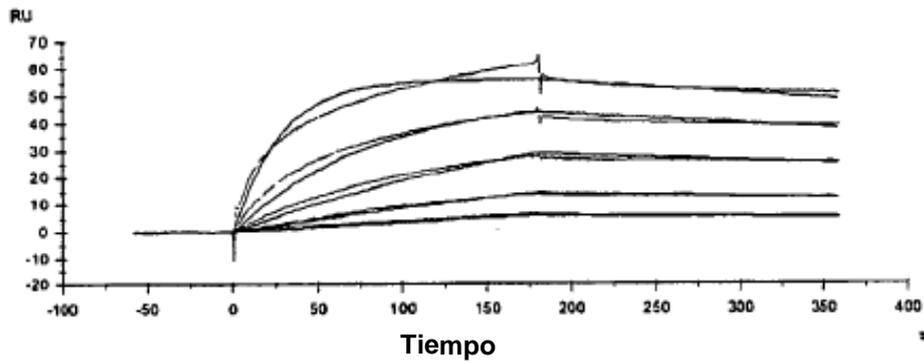


Figura 7 parte uno

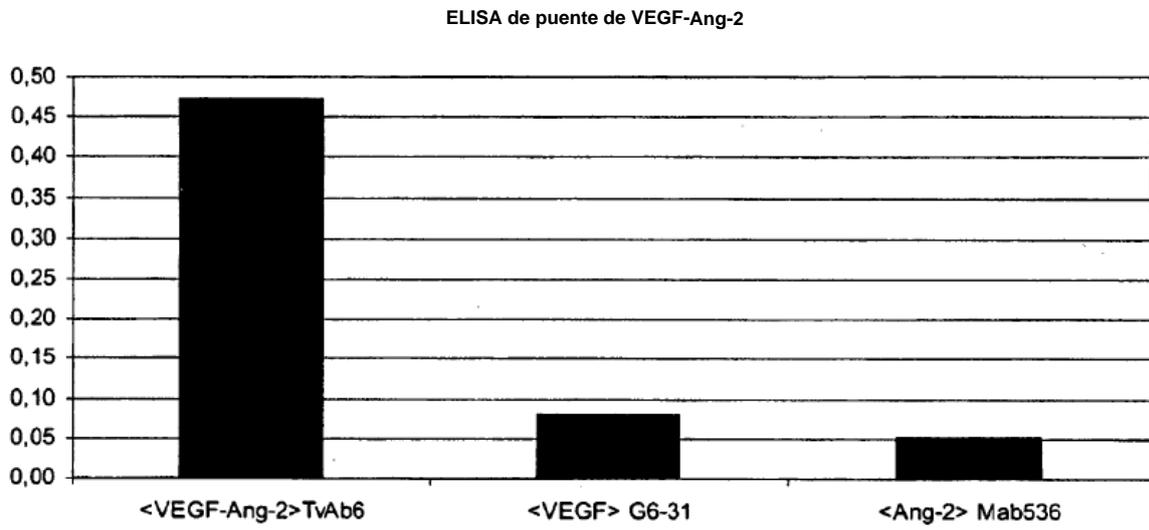


Figura 7 parte dos

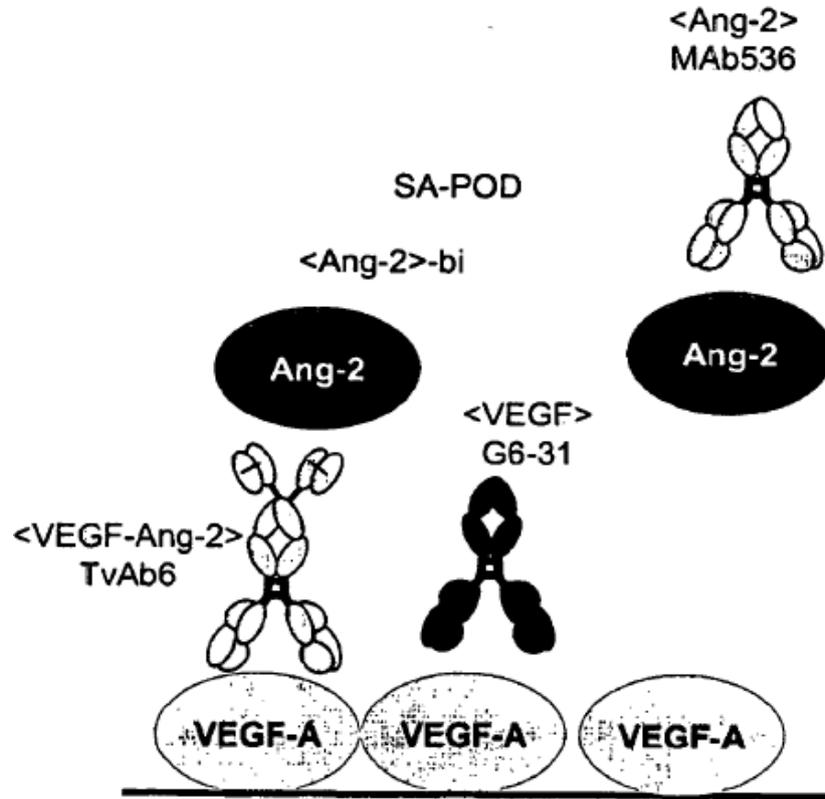


Figura 8A

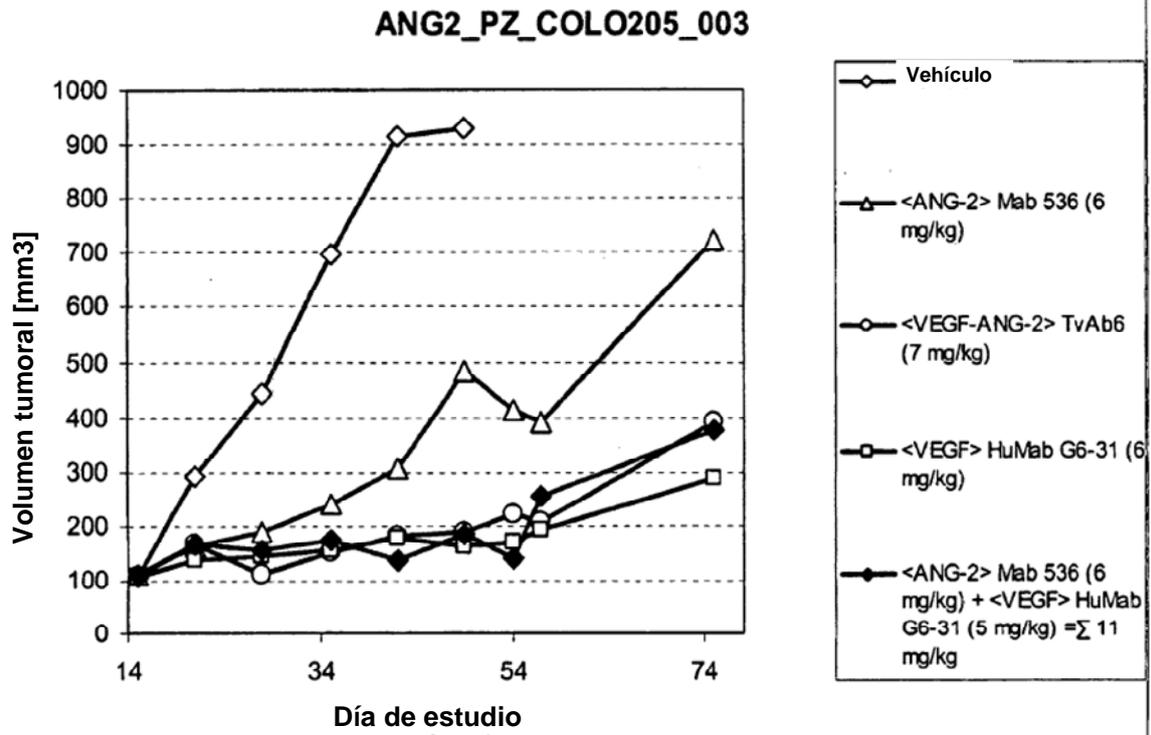


Figura 8B

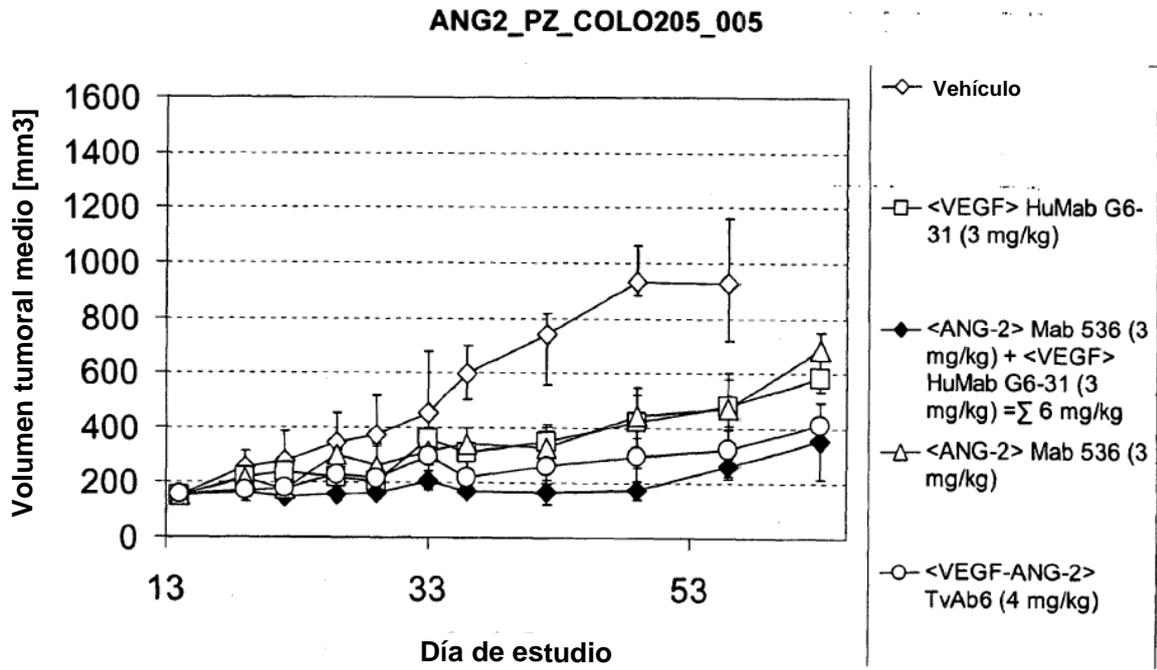


Figura 9

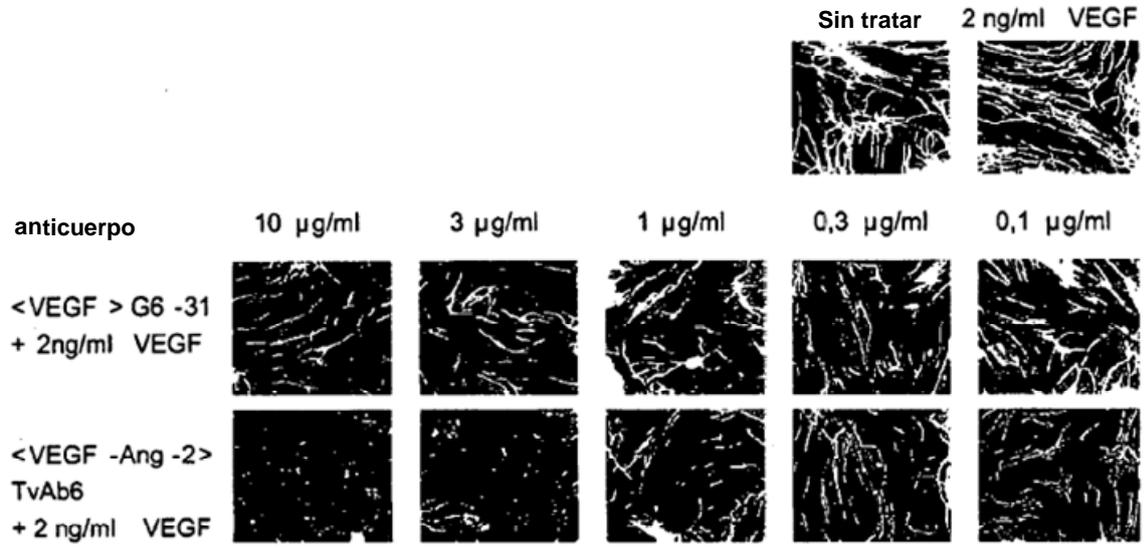


Figura 10A

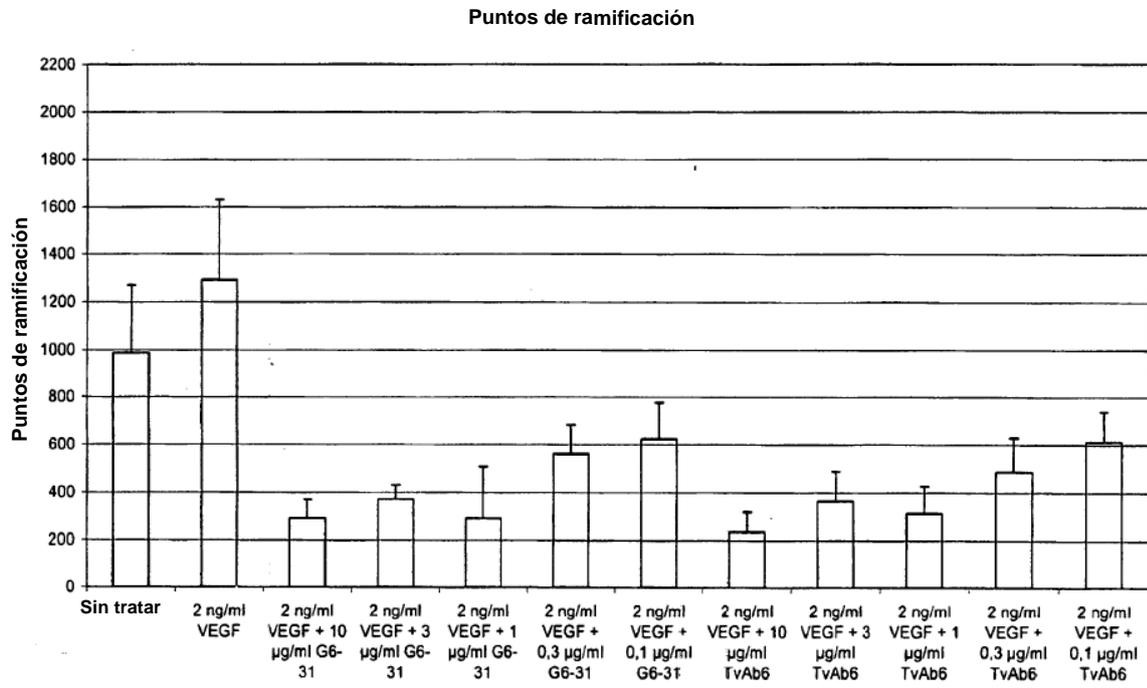


Figura 10B

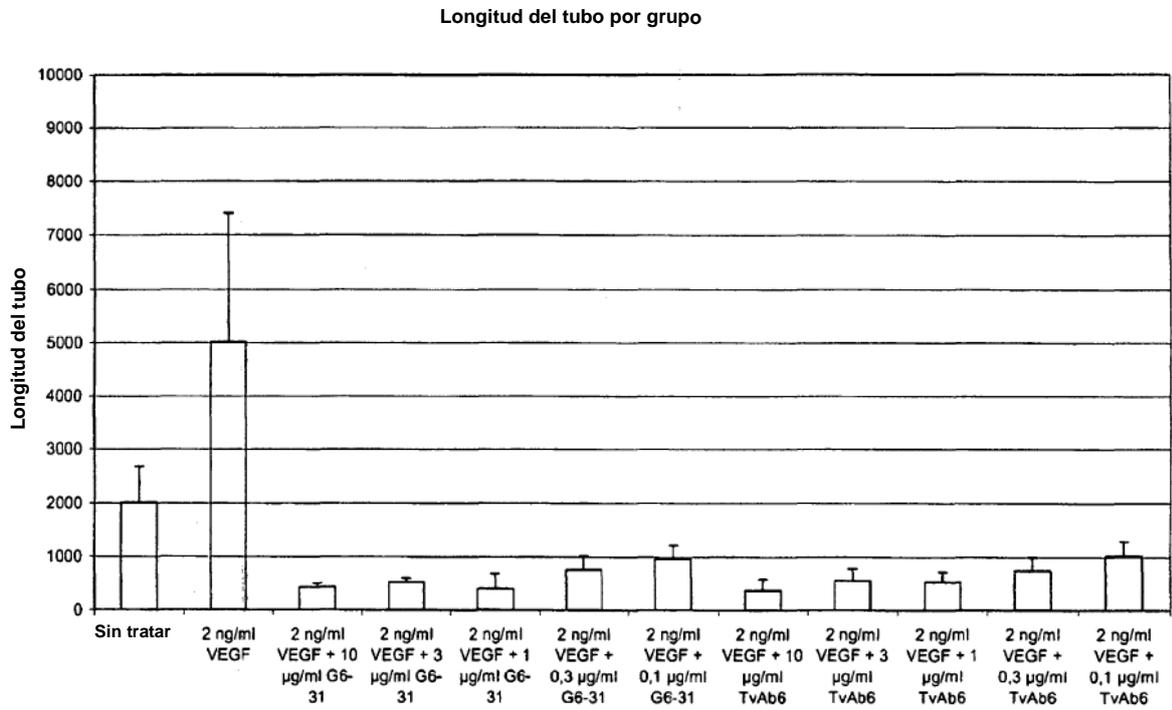


Figura 11

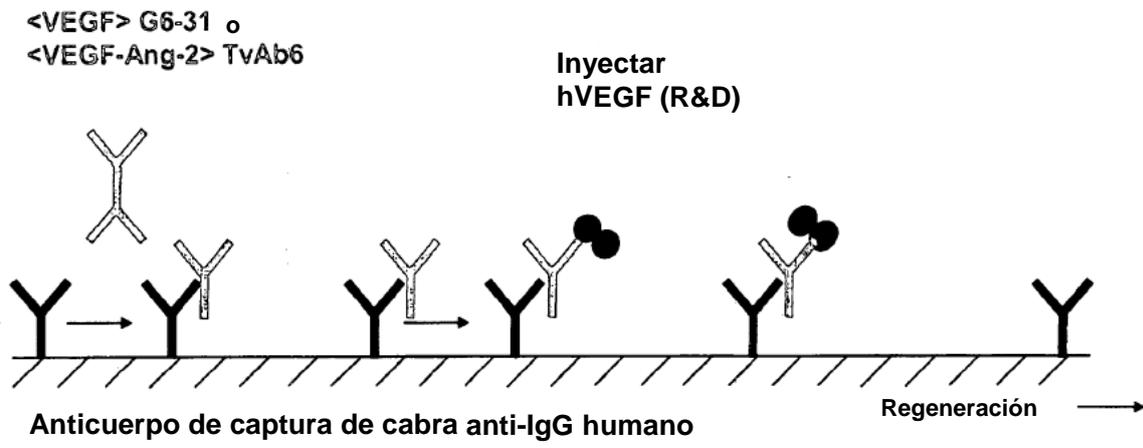
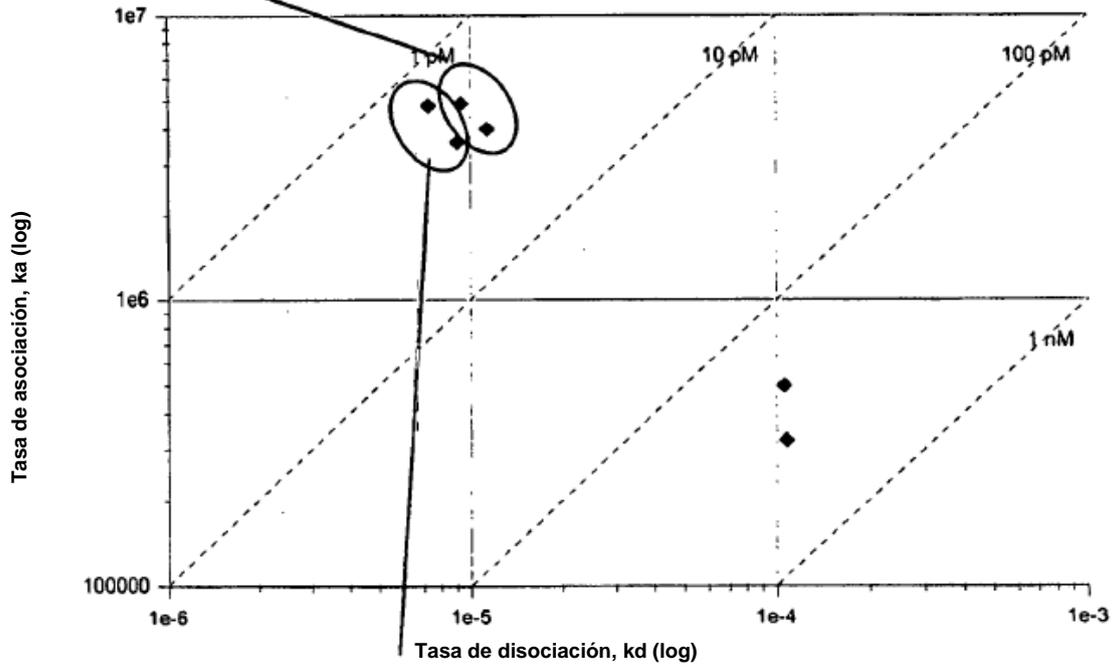


Figura 12

<VEGF-Ang-2>TvAb6



<VEGF> G6-31

Figura 13

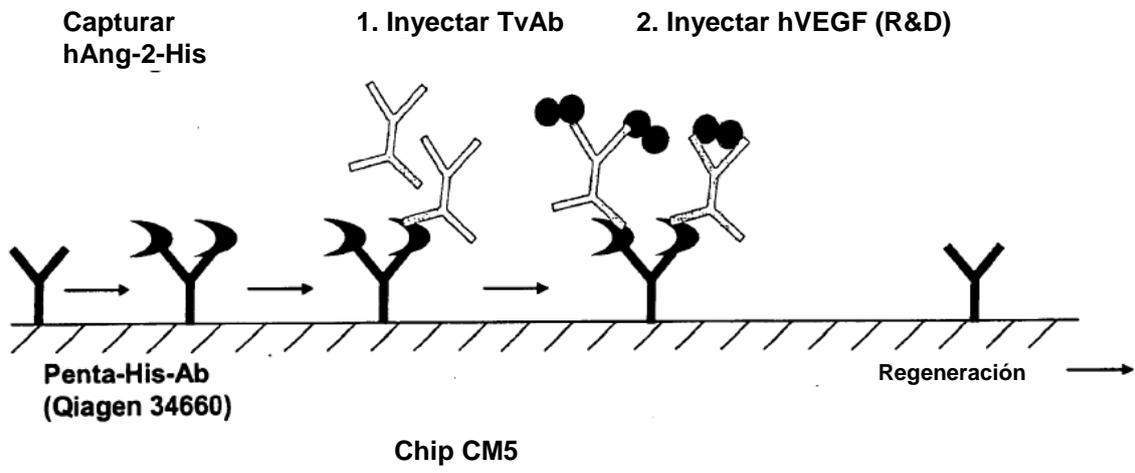


Figura 14

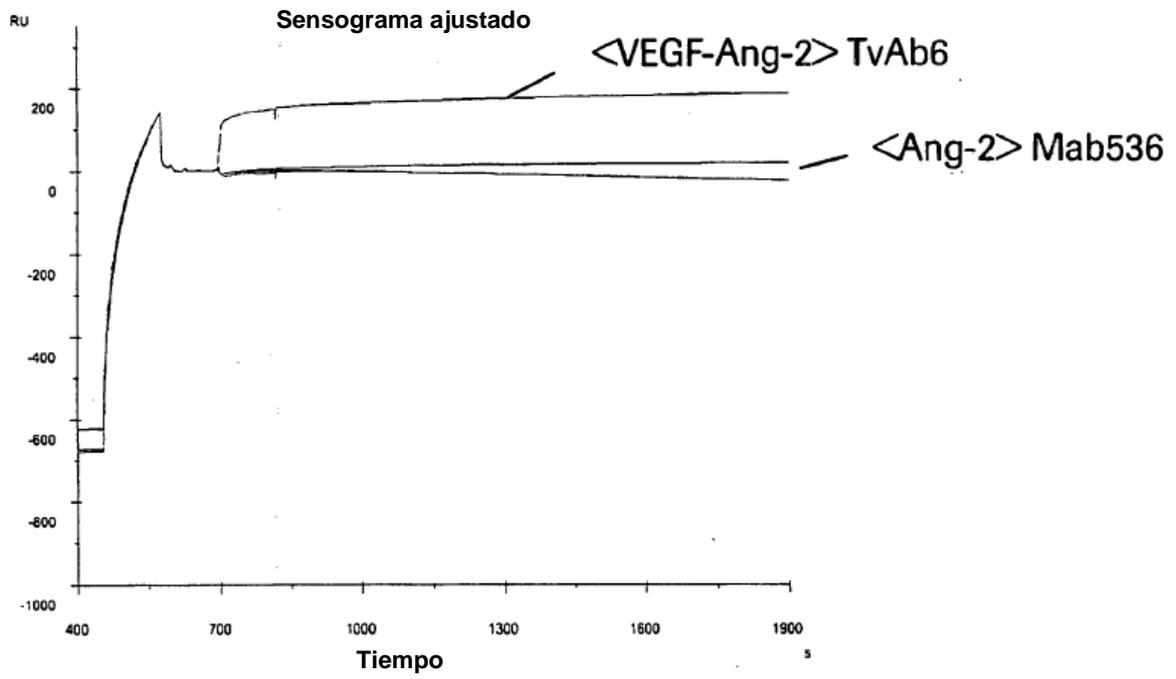


Figura 15A

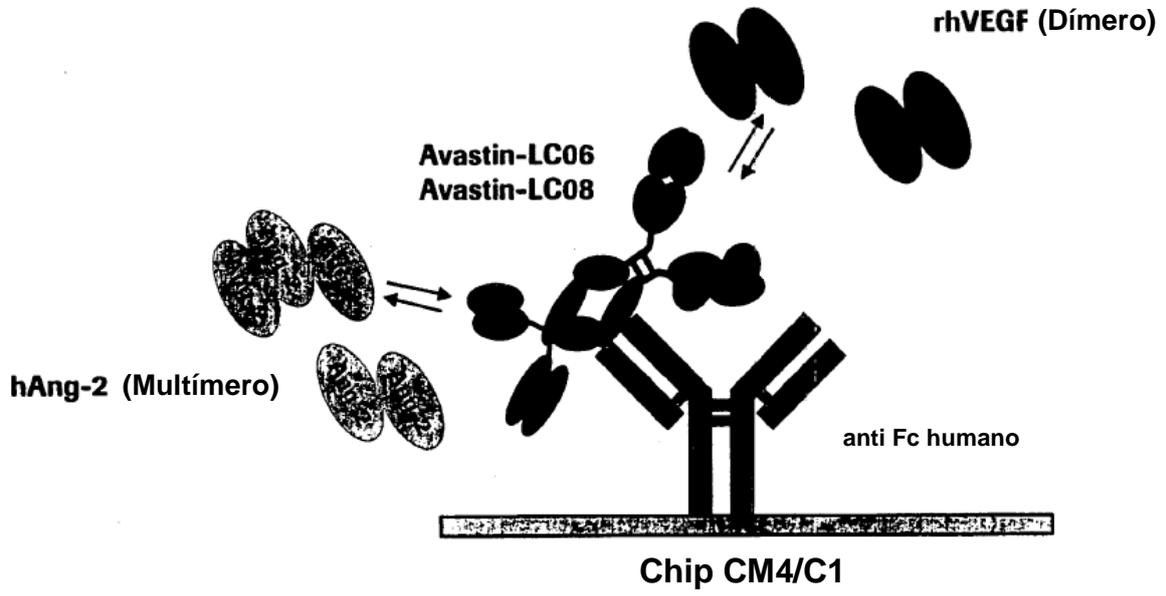


Figura 15B

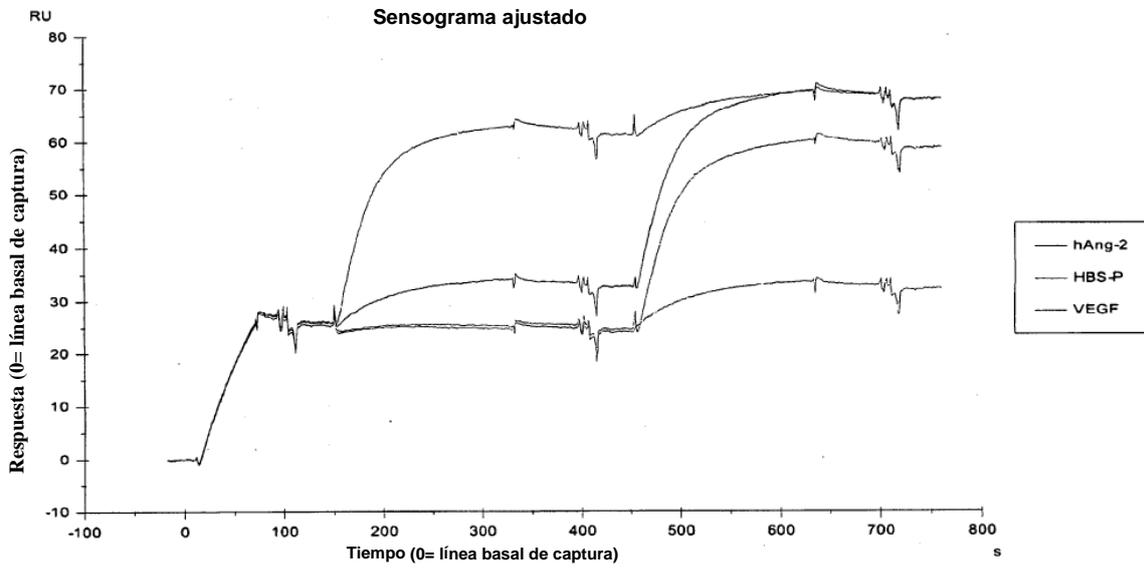


Figura 16A

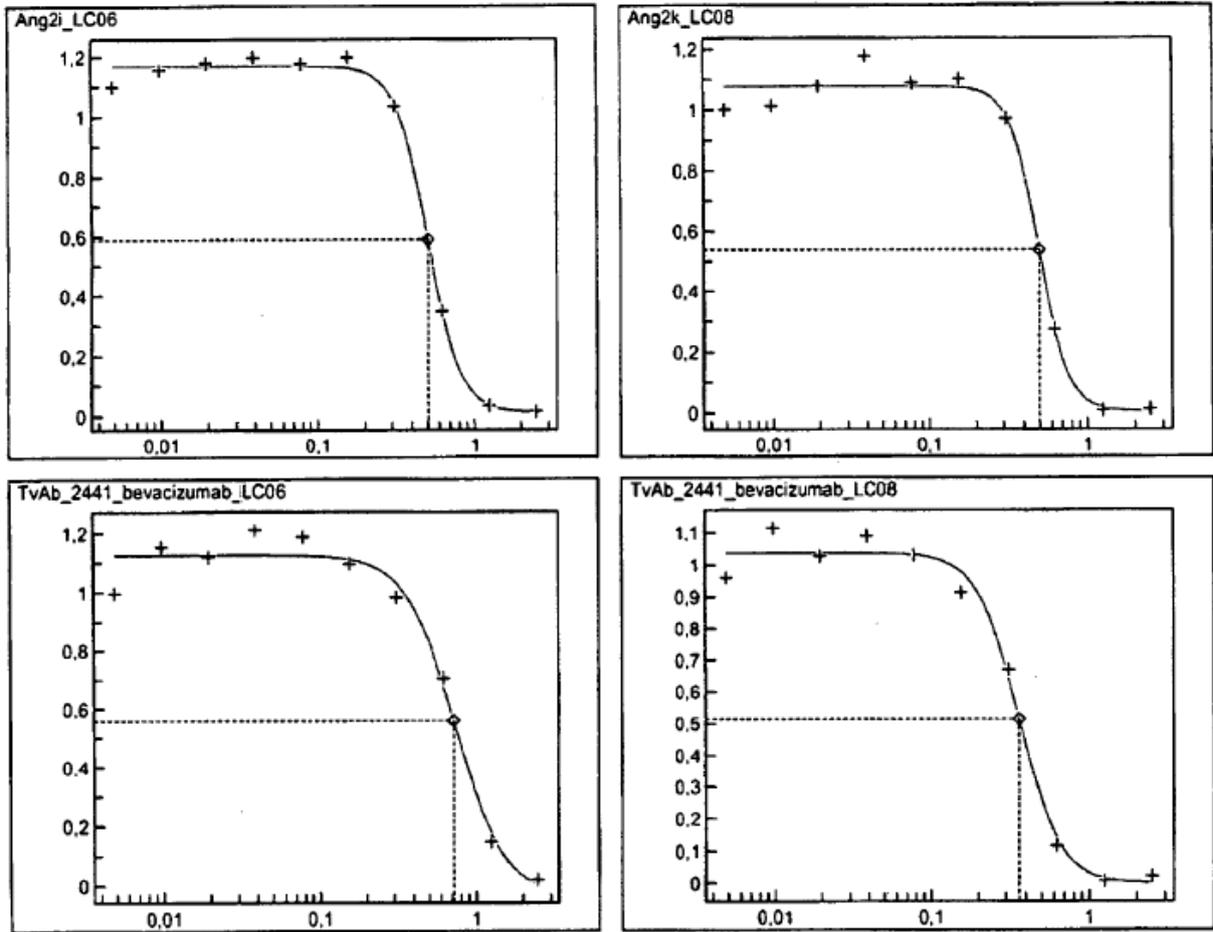


Figura 16B

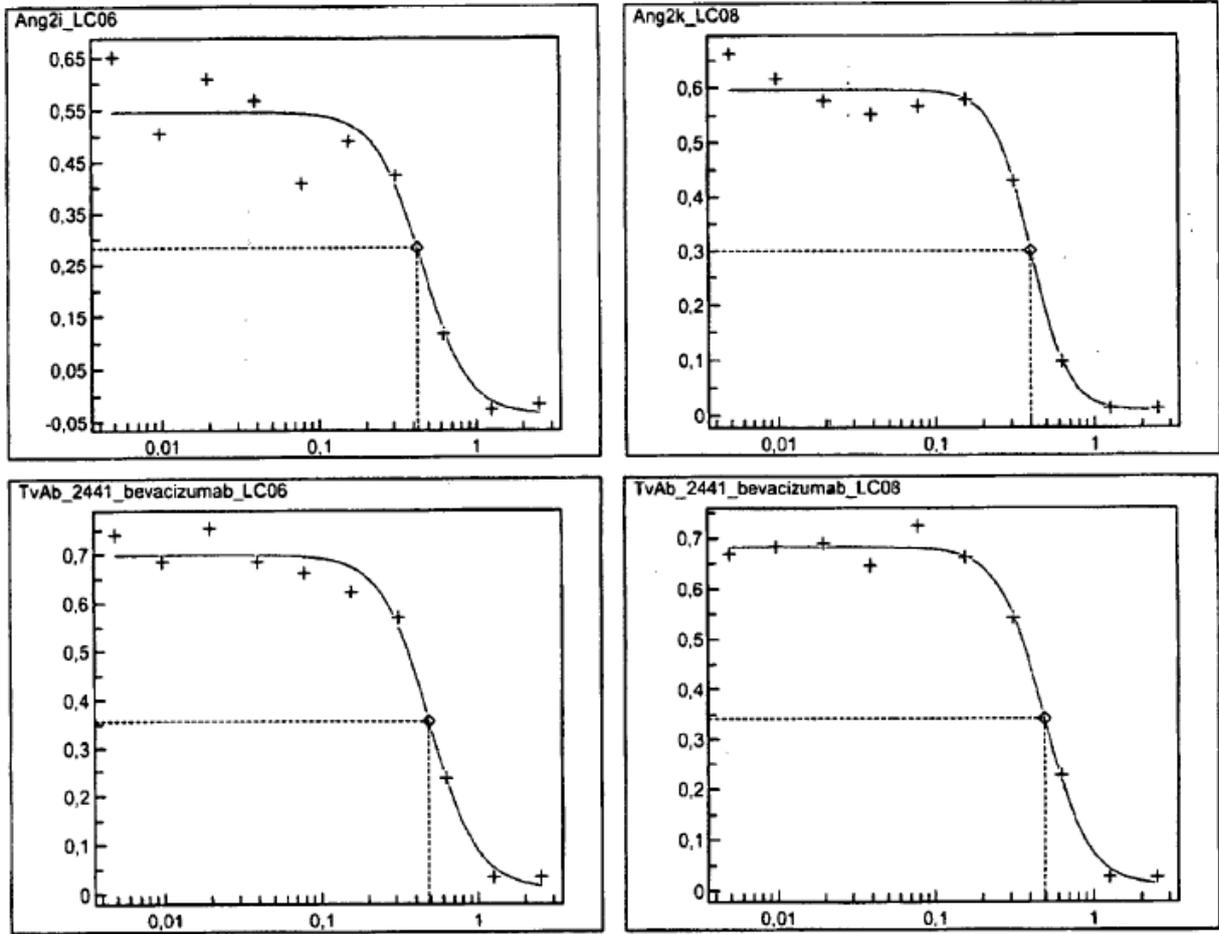


Figura 17

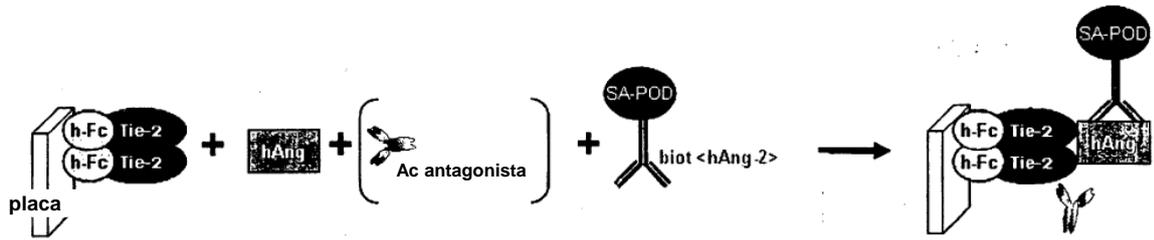


Figura 18

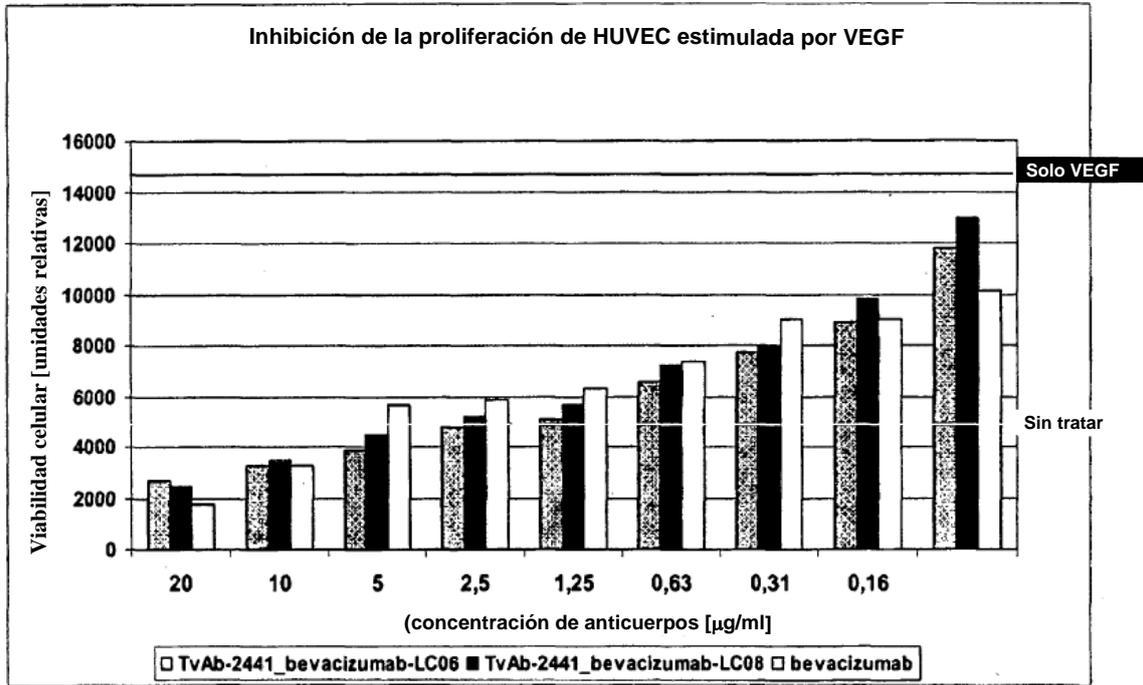


Figura 19

