

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 635**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2009 E 09793471 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2379592**

54 Título: **Anticuerpos contra Angiopoyetina 2 humana**

30 Prioridad:

16.12.2008 EP 08021835

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

27.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRINKMANN, ULRICH;
GRIEP, REMKO ALBERT;
KALUZA, KLAUS;
KAVLIE, ANITA;
KLEIN, CHRISTIAN;
REGULA, JOERG THOMAS y
SCHEUER, WERNER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 534 635 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 contra Angiopoyetina 2 humana

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos contra la Angiopoyetina 2 humana (anticuerpos anti-ANG-2), a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, y a usos de los mismos.

10 Antecedentes de la invención

- 10 La angiogénesis está implicada en la patogénesis de una diversidad de trastornos que incluyen tumores sólidos, síndromes neovasculares intraoculares tales como retinopatías proliferativas o degeneración macular relacionada con la edad (AMD), artritis reumatoide y 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, G. K. (eds.), 2ª edición, Marcel Dekker, Nueva York (1994), pp 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. En consecuencia, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en secciones tumorales y supervivencia del paciente en cáncer de mama así como en varios otros tumores (Weidner, N., *et al.*, N. Engl. J. Med. 324 (1991) 1-8; Horak, E.R., *et al.*, Lancet 340 (1992) 1120-1124; y Macchiarini, P., *et al.*, Lancet 340 (1992) 145-146).

ANG-2 y anticuerpos anti-ANG-2

- 25 La angiopoyetina-2 (ANG-2) humana (como alternativa abreviada con ANGPT2 o ANG2) (SEC ID N°: 107) se describe en Maisonpierre, P.C., *et al.*, Science 277 (1997) 55-60 y Cheung, A.H., *et al.*, Genomics 48 (1998) 389-91. Las angiopoyetinas-1 y 2 (ANG-1 (SEC ID N°: 108) y ANG-2 (SEC ID N°: 107) se descubrieron como ligandos para las Ties, una familia de tirosina quinasa que se expresa selectivamente dentro del endotelio vascular. Yancopoulos, G.D., *et al.*, Nature 407 (2000) 242-48. Hay ahora cuatro miembros definitivos de la familia de la angiopoyetina. La angiopoyetina-3 y 4 (Ang-3 y Ang-4) pueden representar homólogos ampliamente divergentes del mismo locus génico en ratón y ser humano. 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 tisular como agonista y antagonista, respectivamente (véase para ANG-1: Davies, S., *et al.*, Cell, 87 (1996) 1161-1169; y para ANG-2: Maisonpierre, P.C., *et al.*, Science 277 (1997) 55-60). Todas las angiopoyetinas conocidas se unen principalmente a Tie2, y tanto Ang-1 como 2 se unen con Tie2 con una afinidad de 3 nM (Kd). Maisonpierre, P.C., *et al.*, Science 277 (1997) 55-60. Se ha mostrado que Ang-1 apoya la supervivencia de EC y promueve la integridad del endotelio, Davis, S., *et al.*, Cell, 87 (1996) 1161-1169; Kwak, H.J., *et al.*, FEBS Lett 448 (1999) 249-53; Suri, C., *et al.*, Science 282 (1998) 468-71; Thurston, G., *et al.*, Science 286 (1999) 2511-14; Thurston, G., *et al.*, Nat. Med. 6 (2000) 460-63, mientras que ANG-2 tuvo el efecto opuesto y promovió la desestabilización de vasos sanguíneos y regresión en ausencia de los factores de supervivencia VEGF o el factor de crecimiento de fibroblastos básico. Maisonpierre, P.C., *et al.*, 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 de la remodelación vascular que desempeña un papel tanto en el brote de vasos como en la regresión de vasos. Los análisis de expresión revelan que ANG-2 se induce rápidamente, junto con VEGF, en situaciones de brote angiogénico en adultos, mientras que ANG-2 se induce en ausencia de VEGF en situaciones de regresión vascular, lo que apoya dichos papeles para ANG-2. Holash, J., *et al.*, Science 284 (1999) 1994-98; Holash, J., *et al.*, Oncogene 18 (1999) 5356-62. De forma coherente con un papel dependiente de contexto, ANG-2 se une específicamente con el mismo receptor específico de endotelio, Tie-2, que se activa por Ang-1, pero tiene efectos dependientes del contexto en su activación. Maisonpierre, P.C., *et al.*, Science 277 (1997) 55-60.

- 50 Los ensayos de angiogénesis corneana han mostrado que tanto ANG-1 como ANG-2 tenían efectos similares, actuando sinérgicamente con 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 dosis se planteó por la observación de que *in vitro* a alta concentración, ANG-2 también puede ser pro-angiogénica. Kim, I., *et al.*, Oncogene 19 (2000) 4549-52. A alta concentración, ANG-2 actúa como un factor de supervivencia de apoptosis para células endoteliales durante la apoptosis por privación del suero mediante la activación de Tie2 mediante PI-3 Quinasa y la ruta de Akt. Kim, I., *et al.*, Oncogene 19 (2000) 4549-52.

- 60 Otros experimentos *in vitro* ha sugerido que durante la exposición prolongada, los efectos de ANG-2 pueden desplazarse progresivamente de los de un antagonista a un agonista de Tie2, y en puntos temporales posteriores, puede contribuir directamente a la formación de tubos vasculares y estabilización de neovasos. Teichert-Kuliszewska, K., *et al.*, Cardiovasc. Res. 49 (2001) 659-70. Además, si se cultivaron EC en gel de fibrina, también se observó activación de Tie2 con ANG-2, lo que quizás sugiere que la acción de ANG-2 podría depender del estado de diferenciación de las EC. Teichert-Kuliszewska, K., *et al.*, Cardiovasc. Res. 49 (2001) 659-70. En EC microvasculares cultivadas en un gel de colágeno tridimensional, ANG-2 también puede inducir la activación de Tie2 y promover la formación de estructuras de tipo capilar. Mochizuki, Y., *et al.*, J. Cell. Sci. 115 (2002) 175-83. El uso de

un cocultivo esferoide tridimensional como un modelo *in vitro* de maduración de vasos demostró que el contacto directo entre EC y células mesenquimales anula la sensibilidad a VEGF, mientras que la presencia de VEGF y ANG-2 indujo el brote. Korff, T., *et al.*, *Faseb J.* 15 (2001) 447-57. Etoh, T., *et al.* demostraron que en las EC que expresaban constitutivamente Tie2, la expresión de MMP-1, 9 y u-PA estaba regulada positivamente por ANG-2 en presencia de VEGF. Etoh, T., *et al.*, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53. Con un modelo de membrana pupilar *in vivo* Lobov, I.B., *et al.* mostraron que ANG-2 en presencia de VEGF endógeno promueve un aumento rápido del diámetro capilar, remodelación de la lámina basal, proliferación y migración de células endoteliales, y estimula el brote de nuevos vasos sanguíneos. Lobov, I.B., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10. Por el contrario, ANG-2 promueve la muerte de células endoteliales y regresión vascular sin VEGF endógeno. Lobov, I.B., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10. De forma similar, con un modelo de tumor *in vivo*, Vajkoczy, P., *et al.* demostraron que los agregados multicelulares inician el crecimiento vascular por brote angiogénico mediante la expresión simultánea de VEGFR-2 y ANG-2 por endotelio del hospedador y tumorales. Vajkoczy, P., *et al.*, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 777-85. Este modelo ilustró que la microvasculatura establecida de tumores crecientes se caracteriza por una remodelación continua, mediada potencialmente por la expresión de VEGF y ANG. Vajkoczy, M.A., *et al.*, *J. Clin. Invest.* 09 (2002) 777-85.

Estudios de ratones knock-out de Tie-2 y angiopoyetina-1 muestran fenotipos similares y sugieren que la fosforilación de Tie-2 estimulada por angiopoyetina 1 media en la remodelación y estabilización de vasos en desarrollo, promoviendo la maduración de vasos sanguíneos durante la angiogénesis y el mantenimiento de la adhesión celular de soporte de células endoteliales. (Dumont, D.J., *et al.*, *Genes & Development*, 8 (1994) 1897-1909; Sato, T.N., *Nature*, 376 (1995) 70-74; Thurston, G., *et al.*, *Nature Medicine* 6 (2000) 460-463). Se cree que el papel de la Angiopoyetina-1 está conservado en el adulto, donde se expresa ampliamente y de forma constitutiva (Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50; Zagzag, D., *et al.*, *Exp Neurology*, 159 (1999) 391-400). Por el contrario, la expresión de Angiopoyetina-2 está limitada principalmente a sitios de remodelación vascular donde se cree que bloquea la función de estabilización o maduración constitutiva de la Angiopoyetina-1, permitiendo que los vasos vuelvan a, y permanezcan en, un estado plástico que puede ser más sensible a señales de brote (Hanahan, D., 1997; Holash, J., *et al.*, *Orzcogerze* 18 (1999) 5356-62; Maisonpierre, P.C., 1997). Los estudios de la expresión de Angiopoyetina-2 en angiogénesis patológica han descubierto que muchos tipos tumorales muestran expresión de Angiopoyetina-2 vascular (Maisonpierre, P.C., *et al.*, *Science* 277 (1997) 55-60). Los estudios funcionales sugieren que la Angiopoyetina-2 está implicada en la angiogénesis tumoral y asocian la sobreexpresión de Angiopoyetina-2 con aumento del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón (Ahmad, S.A., *et al.*, *Cancer Res.*, 61 (2001)1255-1259). Otros estudios han asociado la sobreexpresión de Angiopoyetina-2 con la hipervascularidad tumoral (Etoh, T., *et al.*, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53; Tanaka, F., *et al.*, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29).

En años recientes, se han propuesto la Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-2 y/o Tie-2 como posibles dianas terapéuticas antineoplásicas. Por ejemplo, los documentos US 6.166.185, US 5.650.490 y US 5.814.464 desvelan cada uno anticuerpos anti-ligando y receptor de Tie-2. Se han presentado estudios que usan Tie-2 soluble que reducen el número y tamaño de tumores en roedores (Lin, P, 1997; Lin, P., 1998). Siemester, G., *et al.* (1999) generaron líneas celulares de melanoma humano que expresaban el dominio extracelular de Tie-2, las inyectaron en ratones desnudos e indicaron que Tie-2 soluble daba como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral y la angiogénesis tumoral. Dado que tanto la Angiopoyetina-1 como la Angiopoyetina-2 se unen con Tie-2, no está claro a partir de estos estudios si la Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-2 o Tie-2 serían una diana atractiva para la terapia antineoplásica. Sin embargo, se cree que la terapia anti-angiopoyetina-2 eficaz es beneficiosa para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer, en las que la progresión depende de la angiogénesis aberrante cuando el bloqueo del proceso puede conducir a prevención del avance de la enfermedad (Folkman, J., *Nature Medicine.* 1, (1995) 27-31).

Además algunos grupos han indicado el uso de anticuerpos y péptidos que se unen con Angiopoyetina-2. Véase, por ejemplo, documentos US 6.166.185 y US 2003/10124129, 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 mostrado que la antagonización de la señal de Angiopoyetina-1/Tie-2 relaja la estructura vascular estrecha exponiendo de este modo las EC a señales activadoras de inductores de angiogénesis, por ejemplo VEGF (Hanahan, 1997). Este efecto pro-angiogénico resultante de la inhibición de la Angiopoyetina-1 indica que la terapia con anti-Angiopoyetina-1 no sería un tratamiento antineoplásico eficaz.

La ANG-2 se expresa durante el desarrollo en sitios en los que se produce remodelación de vasos sanguíneos. Maisonpierre, P.C., *et al.*, *Science* 277 (1997) 55-60. En individuos adultos, la expresión de ANG-2 está restringida a sitios de remodelación vascular así como en 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) 1967-76, cáncer de pulmón de células no pequeñas, Wong, M.P., *et al.*, *Lung Cancer* 29 (2000) 11-22, y cáncer de colon, Ahmad, S.A., *et al.*, *Cancer* 92 (2001) 1138-43, y próstata Wurmbach, J.H., *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 detectaron ARNm de ANG-2 en 10 de 12 muestras de ensayo de carcinoma hepatocelular humano (HCC). El grupo de Ellis indicó que ANG-2 se expresa de forma ubicua en epitelio tumoral. Ahmad, S.A., *et al.*, Cancer 92 (2001) 1138-43. Otros investigadores han presentado hallazgos similares. Chen, L., *et al.*, J. Tongji Med. Univ. 21 (2001) 228-30, 235 (2001). Detectando los niveles de ARNm de ANG-2 en muestras de ensayo de cáncer de mama humano archivadas, Sfilogoi, C., *et al.*, Int. J. Cancer 103 (2003) 466-74 indicaron que el ARNm de ANG-2 se asocia significativamente con invasión de ganglios linfáticos auxiliares, tiempo sin enfermedad corto y escasa supervivencia general. Tanaka, F., *et al.*, Cancer Res. 62 (2002) 7124-29 revisaron un total de 236 pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) con estadio patológico I a IIIA, respectivamente. Usando inmunohistoquímica, descubrieron que el 16,9 % de los pacientes con NSCLC eran positivos para ANG-2. La densidad microvascular para tumor positivo para ANG-2 es significativamente mayor que la de negativos para ANG-2. Dicho efecto angiogénico de ANG-2 se ha visto solamente cuando la expresión de VEGF era alta. Además, la expresión positiva de ANG-2 era un factor significativo para predecir una escasa supervivencia postoperatoria. Tanaka, F., *et al.*, Cancer Res. 62 (2002) 7124-29. Sin embargo, no descubrieron ninguna correlación significativa entre la expresión de Ang-1 y la densidad microvascular. Tanaka, F., *et al.*, Cancer Res. 62 (2002) 7124-29. Estos resultados sugieren que ANG-2 es un indicador de pacientes con mal pronóstico con varios tipos de cáncer.

Recientemente, usando un modelo de ratón con supresión de ANG-2, el grupo de Yancopoulos indicó que se requería ANG-2 para la angiogénesis postnatal. Gale, N.W., *et al.*, Dev. Cell 3 (2002) 411-23. Mostraron que la regresión programada por el desarrollo de la vasculatura hialoide en el ojo no aparece en los ratones con supresión ANG-2 y sus vasos sanguíneos retinianos no consiguen brotar de la arteria retiniana central. Gale, N.W., *et al.*, Dev. Cell 3 (2002) 411-23. También descubrieron que la supresión de ANG-2 da como resultado defectos profundos en el patrón y la función de la vasculatura linfática. Gale, N.W., *et al.*, Dev. Cell 3 (2002) 411-23. El rescate genético con Ang-1 corrige los defectos linfáticos, pero no los de angiogénesis. Gale, N.W., *et al.*, Dev. Cell 3 (2002) 411-23.

Peters y colaboradores indicaron que Tie2 soluble, cuando se suministra como proteína recombinante o en un vector de expresión viral, inhibía el crecimiento *in vivo* de carcinoma mamario murino y 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 tratados de este modo se redujeron en gran medida. Además, Tie2 soluble bloqueó la angiogénesis en el corneano de rata estimulado por medio acondicionado para 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 promovía neovascularidad circunferencial que VEGF solo. Asahara, T., *et al.*, Circ. Res., 83 (1998) 233-40. El receptor de Tie2 soluble en exceso evitó la modulación de neovascularización inducida por VEGF por ANG-2. Asahara, T., *et al.*, Circ. Res., 83, (1998) 233-40. Siemeister, G., *et al.*, Cancer Res. 59 (1999) 3185-91 mostraron con xenoinjertos de ratones desnudos que la sobreexpresión de los dominios de unión a ligando extracelulares de Flt-1 o Tie2 en los xenoinjertos da como resultado inhibición significativa de ruta que no podría compensarse por el otro, lo que sugiere que la ruta del receptor de VEGF y la ruta de Tie2 deberían considerarse como dos mediadores independientes esenciales para el proceso de la angiogénesis *in vivo*. Siemeister, G., *et al.*, Cancer Res. 59 (1999) 3185-91. Eso se demuestra por una publicación más reciente de White, R.R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5028-33. En su estudio, se demostró que un aptámero de ARN resistente a nucleasa que se une específicamente con e inhibe ANG-2 inhibía significativamente la neovascularización inducida por bFGF en el modelo de angiogénesis de microbolsillos corneanos de rata.

Sumario de la invención

La invención comprende un anticuerpo que se une específicamente con angiopoyetina-2 (ANG-2) humana como se define en las reivindicaciones.

Preferentemente, el anticuerpo se caracteriza por que el anticuerpo no se une específicamente con angiopoyetina-1 (ANG-1).

Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Una realización adicional de la invención es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de una composición farmacéutica.

Una realización adicional de la invención es el anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en la prevención de la metástasis.

Una realización adicional de la invención es el anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

Una realización adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares.

Una realización adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de retinopatía.

5 Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

10 La invención proporciona además vectores de expresión que contienen ácido nucleico de acuerdo con la invención capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula hospedadora procariota o eucariota, y células hospedadoras que contienen dichos vectores para la producción recombinante de dicho anticuerpo.

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

20 La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo humano o humanizado recombinante de acuerdo con la invención, caracterizado por la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula hospedadora procariota o eucariota y la recuperación de dicho anticuerpo de dicha célula o el sobrenadante de cultivo celular. La invención comprende además el anticuerpo que puede obtenerse por dicho método recombinante.

25 Los anticuerpos de acuerdo con la invención son especialmente útiles para la prevención de tumores secundarios/metástasis o el tratamiento de enfermedades vasculares tales como retinopatías.

Descripción detallada de la invención

30 La invención comprende un anticuerpo que se une específicamente con angiopoyetina-2 (ANG-2) humana.

Como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza por que

35 a) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEC ID N°: 1, una región de CDR2 de SEC ID N°: 2 y una región CDR1 de SEC ID N°: 3; y

b) el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEC ID N°: 4, una región de CDR2 de SEC ID N°: 5 y una región CDR1 de SEC ID N°: 6.

40 En una realización, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza por que comprende

a) el dominio variable de cadena pesada de SEC ID N°: 7; y

b) el dominio variable de cadena ligera de SEC ID N°: 8.

45 Otra realización de la invención es un anticuerpo que se une específicamente con ANG-2 humana, que se caracteriza por que el anticuerpo no se une específicamente con angiopoyetina-1 (ANG-1) humana. Dichos anticuerpos que se unen específicamente con ANG-2, pero no con ANG-1 pueden tener propiedades mejoradas tales como eficacia, menor toxicidad, propiedades farmacocinéticas comparadas con anticuerpos específicos de ANG-2 y ANG-1. El anticuerpo Ang2i_LC06, que tiene regiones CDR de SEC ID N°: 1 a 6, se une específicamente con ANG-2 humana y no se une específicamente con angiopoyetina-1 (ANG-1) humana. Otros anticuerpos que se unen específicamente con ANG-2 humana pero no con ANG-1 humana, son por ejemplo Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC07 y Ang2i_LC10.

50 Preferentemente el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo es de la subclase de IgG1 humana o es de la subclase de IgG4 humana.

55 El término "anticuerpo" abarca las diversas formas de estructuras de anticuerpos incluyendo pero sin limitación anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpo. El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferentemente un anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico, o anticuerpo modificado por ingeniería genética adicionalmente, siempre que se conserven las propiedades características de acuerdo con la invención.

60 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, preferentemente el dominio variable del mismo, o al menos el sitio de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias (scFv o scFab), y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo biespecíficos) formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Se describen anticuerpos scFv, por ejemplo, en Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-88. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que tiene las características de un dominio V_H, concretamente que son capaces de ensamblarse con un dominio V_L, o de un dominio V_L que se une con ANG-2, concretamente que es capaz de ensamblarse junto con un dominio V_H con un sitio de unión a antígeno funcional y proporcionar de este modo la propiedad. Los scFv pueden estabilizarse usando por ejemplo a) estabilización por disulfuro (véase por

ejemplo en el documento WO 94/029350, Rajagopal, V., *et al.*, Prot. Engin. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., *et al.*, Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393; o Schmidt, M., *et al.*, Oncogene (1999) 18 1711-1721) o b) marcos conservados estabilizados (por ejemplo, mutaciones específicas de (véase por ejemplo documento WO 2007/109254) los marcos conservados estabilizados específicos véase por ejemplo documento US7.258.985, Furrer, F., *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50 (2009), pp. 771-778 u Ottiger, M., *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50 (2009), pp. 779-786.

Las expresiones “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpos monoclonales” como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, región de unión, de una fuente o especie y al menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado por técnicas de ADN recombinante. Se prefieren anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de “anticuerpos quiméricos” abarcadas por la presente invención son en las que la región constante se ha modificado o cambiado de la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a unión con C1q y/o unión con receptor de Fc (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan “anticuerpos de clase cambiada”. Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican ADN recombinante convencional y se conocen bien en este campo técnicas de transfección génica. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; documentos US 5.202.238 y US 5.204.244.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos en los que el marco conservado o “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferida, se injerta una CDR murina en la región marco conservada de un anticuerpo humano para preparar el “anticuerpo humanizado”. Véase por ejemplo Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para anticuerpos quiméricos. Otras formas de “anticuerpos humanizados” abarcados por la presente invención son en los que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente a partir del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a unión con C1q y/o unión con el receptor de Fc (FcR).

Se entiende que la expresión “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos se conocen bien en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). También pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a 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; Brueggemann, M., *et al.*, Year Immunol. 7 (1993) 33-40). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom, H.R., y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., *et al.*, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole, S.P.C., *et al.*, y Boerner, *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, S.P.C., *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.R., (1985) 77-96; y Boerner, P., *et al.*, J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Como ya se ha mencionado para anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención la expresión “anticuerpo humano” como se usa en el presente documento también comprende dichos anticuerpos que se ha modificado en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión con C1q y/o la unión con FcR, por ejemplo por “cambio de clase” es decir cambio o mutación de partes Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o mutación IgG1/IgG4).

Se entiende que la expresión “anticuerpo humano recombinante”, como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula hospedadora tal como una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en una forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a 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 derivan de y están relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (V_L), dominio variable de una cadena pesada (V_H)) como se usa en el presente documento indica cada uno del par de dominios de cadena ligera y pesada que están implicados directamente en la unión del anticuerpo con el antígeno. Los dominios de cadena ligera y pesada variables tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco conservadas (FR) cuya secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco conservadas adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones marco conservadas y forman junto con las CDR de la otra cadena el sitio de unión a antígeno. Las regiones CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo desempeñan 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.

La expresión "parte de unión a antígeno de un anticuerpo" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de unión a antígeno. La parte de unión a antígeno de un anticuerpo comprende restos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "marco conservadas" o "FR" son las regiones de dominio variable distintas de los restos de región hipervariable como se define en el presente documento. Por lo tanto, los dominios variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo comprenden del extremo N al C terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión a antígeno y define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición convencional de Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o los restos de un "bucle hipervariable".

Se entiende que las expresiones "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", como se usan en el presente documento, incluyen moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

El término "aminoácido" como se usa en la presente solicitud indica el grupo de carboxilo α -aminoácidos de origen natural que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se sitúa en una relación funcional con otro ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está "unido operativamente" con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificante si se sitúa de modo que facilite la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son colineales y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. Se consigue unión mediante ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan de acuerdo con la práctica convencional adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o enlazadores.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable y todas estas denominaciones incluyen descendencia. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen las células objeto primarias y cultivos derivados de ellas independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica con respecto a la que se explora en la célula transformada originalmente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "de unión" o "de unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo con un epítipo del antígeno (ANG-2) en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) (Ejemplo 3) con antígeno de ANG-2 de tipo silvestre purificado. La afinidad de la unión se define por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). De unión o unión específica significa una afinidad de unión (K_d) de 10^{-8} mol/l o menos, preferentemente 10^{-9} M a 10^{-13} mol/l.

La unión del anticuerpo con el $Fc\gamma RII$ puede investigarse por un ensayo de BIAcore (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a).

Como se usa en el presente documento, la expresión "que no se une con ANG-1" o "que no se une específicamente con ANG-1" indica que el anticuerpo tiene un valor de CE_{50} por encima de 8000 ng/ml en un ensayo de ELISA de unión con ANG-2 *in vitro* (de acuerdo con el Ejemplo 2).

El término “epítipo” incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente con un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el determinante epitópico incluye agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno con el que se une un anticuerpo.

La “parte Fc” de un anticuerpo no está implicada directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestra diversas funciones efectoras. Una “parte Fc de un anticuerpo” es una expresión bien conocida por el experto en la materia y definida basándose en la escisión con papaína de anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, IgA1 e IgA2. De acuerdo con las regiones constantes de cadena pesada las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. La parte Fc de un anticuerpo está implicada directamente en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) basándose en la activación del complemento, unión con C1q y unión con el receptor de Fc. La activación del complemento (CDC) se inicia mediante la unión del factor del complemento C1q con la parte Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpo IgG. Aunque la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento depende de ciertas condiciones, la unión con C1q está provocada por sitios de unión definidos en la parte Fc. Dichos sitios de unión se conocen en el estado de la técnica y se describen por ejemplo en Boakle, R.J., *et al.*, Nature 282 (1975) 742-743, Lukas, T.J., *et al.*, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse, R., y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917, Burton, D.R., *et al.*, Nature 288 (1980) 338-344, Thommesen, J.E., *et al.*, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004, Idusogie, E.E., *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184, Hezareh, M., *et al.*, J. Virology 75 (2001) 12161-12168, Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324, documento EP 0307434. Dichos sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat, véase posteriormente). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 habitualmente muestran activación del complemento y unión con C1q y C3, mientras que IgG4 no activan el sistema del complemento y no se unen con C1q y C3.

El anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferentemente una parte de Fc de origen humano que es parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1.

El anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza por que las cadenas constantes son de origen humano. Dichas cadenas constantes se conocen bien en el estado de la técnica y se describen por ejemplo en Kabat, E.A. (véase por ejemplo Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218). Por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 57 o de SEC ID N°: 58. Por ejemplo, una región constante de cadena ligera humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa de SEC ID N°: 59, o de una región constante de cadena ligera lambda de SEC ID N°: 60.

La expresión “región constante” como se usa dentro de la presente solicitud indica la suma de los dominios de un anticuerpo distintos de la región variable. La región constante no está implicada directamente en la unión de un antígeno, pero muestra 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 estas pueden dividirse adicionalmente en subclases, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de cadena ligera que pueden encontrarse en las cinco clases de anticuerpo se denominan κ (kappa) y λ (lambda).

La expresión “región constante derivada de origen humano” como se usa en la presente solicitud indica una región de cadena pesada constante de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región κ de cadena ligera constante. Dichas regiones constantes se conocen en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo en Kabat, E.A., (véase, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788).

Aunque los anticuerpos de la subclase IgG4 muestran unión con el receptor de Fc (Fc γ R1IIa) reducida, los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435 son restos que, si se alteran, proporcionan también unión con el receptor de Fc reducida (Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., *et al.*, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324; document EP 0 307 434).

En una realización un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una unión con FcR reducida en comparación con un anticuerpo IgG1 y el anticuerpo parental bivalente monoespecífico es con respecto a unión con FcR de subclase IgG4 o de subclase IgG1 o IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En otra realización, las mutaciones en el anticuerpo parental bivalente monoespecífico son en IgG4 S228P y en

5 IgG1 L234A y L235A. Las regiones constantes de cadena pesada se muestran en SEC ID N: 57 y 58. En una realización, la región de cadena pesada constante del anticuerpo parental bivalente mono-específico es de SEC ID N: 57 con mutaciones L234A y L235A. En otra realización la región de cadena pesada constante del anticuerpo parental bivalente mono-específico es de SEC ID N: 58 con la mutación S228P. En otra realización la región de cadena ligera constante del anticuerpo parental bivalente mono-específico es una región de cadena ligera kappa de SEC ID N: 59 o de una región constante de cadena ligera lambda de SEC ID N: 60. En una realización de la invención la región constante de cadena pesada del anticuerpo parental bivalente mono-específico es de SEC ID N: 57 o de SEC ID N: 58 con la mutación S228P.

10 La región constante de un anticuerpo está implicada directamente en ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente de complemento). La activación del complemento (CDC) se inicia por la unión del factor de complemento C1q con la región constante de la mayoría de las subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q con un anticuerpo está provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el llamado sitio de unión. Dichos de sitios de unión de región constante se conocen en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en T.J., *et al.*, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., *et al.*, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., *et al.*, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., *et al.*, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324; y documento EP 0 307 434. Dichos sitios de unión de 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 EU de Kabat).

20 La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)" se refiere a lisis de células diana humanas por un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente por 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 PBMC recién aisladas o células efectoras purificadas de capas leucocíticas, como monocitos o linfocitos citotóxicos naturales (NK) o una línea celular NK permanentemente creciente.

25 La expresión "citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)" indica un proceso iniciado por la unión del factor de complemento C1q con la parte Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q con un anticuerpo está provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el llamado sitio de unión. Dichos sitios de unión a parte Fc se conocen en el estado de la técnica (véase anteriormente). Dichos sitios de unión a parte Fc se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 habitualmente muestran activación del complemento incluyendo unión con C1q y C3, mientras que IgG4 no activa el sistema de complemento y no se une con C1q y/o C3.

30 El anticuerpo de acuerdo con la invención se produce por medios 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. Se conocen ampliamente en el estado de la técnica métodos para producción recombinante y comprenden expresión de proteínas en células procariontas y eucariotas con aislamiento posterior del anticuerpo y habitualmente purificación con una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos como se ha mencionado anteriormente en una célula hospedadora, se insertan ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligera y pesada modificadas respectivas en vectores de expresión por métodos convencionales. Se realiza expresión en células hospedadoras procariontas o eucariotas apropiadas como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levadura o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de lisis). Se conocen bien en el estado de la técnica métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., 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., J. Drug Res. 48 (1998) 870-880.

40 Los anticuerpos de acuerdo con la invención se separan convenientemente del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Se aísla fácilmente ADN y ARN que codifica los anticuerpos monoclonales y se secuencia usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden actuar como una fuente de dicho ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células hospedadoras.

50 Se preparan variantes de secuencias de aminoácidos (o mutantes) del anticuerpo de acuerdo con la invención introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo o por síntesis de nucleótidos. Dichas modificaciones pueden realizarse, sin embargo, solamente en un intervalo muy limitado, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de anticuerpos anteriormente

mencionadas tales como el isotipo de IgG y la unión con antígeno, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, estabilidad de proteínas o facilitar la purificación.

La expresión "célula hospedadora" como se usa en la presente solicitud indica cualquier tipo de sistema celular que puede modificarse técnicamente para generar los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En una realización se usan células HEK293 y células CHO como células hospedadoras. Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable y todas estas designaciones incluyen descendencia. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de ella independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica con respecto a la que se exploró la célula transformada originalmente.

La expresión en células NS0 se describe, por ejemplo, en 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 en, por ejemplo, Durocher, Y., *et al.*, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9. La clonación de 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; y Norderhaug, L., *et al.*, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitorio preferido (HEK 293) se describe por Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en Cytotechnology 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.-J., en 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 a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificante si se sitúa para facilitar la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. Se consigue el enlace por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o enlazadores de acuerdo con la práctica convencional.

Se realiza purificación de anticuerpos para eliminar componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/con SDS, bandeo de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en este campo. 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 usan de forma generalizada para purificación de proteínas, tal como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de amino etilo) e intercambio de modo mixto), adsorción tiófila (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y otros ligandos de SH), interacción hidrófoba o cromatografía de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sepharose, resinas aza-arenófilas, o ácido *m*-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad de quelados metálicos (por ejemplo con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y métodos electroforéticos (tal como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A. Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

Se desvela un método para el tratamiento de un paciente que necesite terapia, caracterizado por administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La invención comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención para uso en terapia.

La invención comprende el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para la prevención de metástasis.

La invención comprende el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para tratamiento de cáncer.

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 preparación de una composición farmacéutica. Un aspecto adicional de la invención es un método para la preparación 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.

Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica para uso en la prevención de metástasis.

5 Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso en la prevención de metástasis.

Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención de metástasis.

10 Otro aspecto de la divulgación es un método para la prevención de metástasis en un paciente que padece cáncer primario administrando un anticuerpo de acuerdo con la invención a un paciente que necesite dicho tratamiento preventivo.

15 Se podría mostrar prevención altamente eficaz de metástasis espontáneas/tumores secundarios *in vivo* en un modelo de cáncer ortotópico y uno subcutáneo (véase Ejemplo 9) (a diferencia del modelo experimental en el que las células tumorales se inyectan i.v.). Esto es similar a la situación clínica en la que se diseminan células de un tumor primario y metastatizan a un órgano secundario como pulmón o hígado (donde se producen tumores secundarios).

20 El término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a la transmisión de células cancerosas del tumor primario a uno o más sitios en otra parte en un paciente donde después se desarrollan tumores secundarios. Se conocen en la técnica medios para determinar si un cáncer se ha metastatizado e incluyen exploración de hueso, rayos X del pecho, exploración por CAT, exploración por MRI y ensayos de marcadores tumorales.

25 La expresión "prevención de metástasis" o "prevención de tumores secundarios" como se usa en el presente documento tiene el mismo significado y se refiere a un agente profiláctico contra metástasis en un paciente que padece cáncer positivo para HER2 con recaída inhibiendo o reduciendo de esta manera una transmisión adicional de células cancerosas del tumor primario a uno o más sitios en otra parte de un paciente. Esto significa que la metástasis del tumor o cáncer primario se previene, retarda o reduce por lo tanto se previene, retarda o reduce el desarrollo de tumores secundarios. Preferentemente la metástasis es decir tumores secundarios del pulmón se previene o reduce, lo que significa que se previene o se reduce la transmisión metastásica de células cancerosas del tumor primario al pulmón.

35 Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en 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.

40 Otro aspecto de la divulgación es un método para el tratamiento de un paciente que padece cáncer administrando un anticuerpo de acuerdo con la invención a un paciente que necesite dicho tratamiento.

45 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéutico" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo por inyección o infusión).

50 Una composición de la presente invención puede administrarse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención por ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones de tampón acuoso. Los vehículos farmacéuticos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos métodos y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica.

60 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usa en el presente documento significan modos de administración distintos de administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intra-esternal.

65

El término cáncer como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioalveolares, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, 5 cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, 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 tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, 10 cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o el uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma de la hipófisis y sarcoma de Ewing, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica como agente anti-angiogénico. Dicho agente anti-angiogénico puede usarse para el tratamiento de cáncer, especialmente tumores sólidos y otras enfermedades vasculares.

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

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares.

Una realización preferida es un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de retinopatía.

Una realización preferida es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de retinopatía.

Otro aspecto de la divulgación es un método de tratamiento de un paciente que padece enfermedades vasculares administrando un anticuerpo de acuerdo con la invención a un paciente que necesite dicho tratamiento.

La expresión "enfermedades vasculares" incluye cáncer, enfermedades inflamatorias, Aterosclerosis, Isquemia, Traumatismo, Septicemia, EPOC, Asma, Diabetes, AMD, Retinopatía, Ictus, Adiposidad, Lesión pulmonar aguda, Hemorragia, Fuga vascular, por ejemplo, inducida por citocinas, Alergia, Enfermedad de Graves, Tiroiditis Autoinmunitaria de Hashimoto, Púrpura Trombocitopénica Idiopática, Arteritis de Células Gigantes, Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), Nefritis Lúpica, Enfermedad de Crohn, Esclerosis Múltiple, Colitis Ulcerosa, especialmente para tumores sólidos, síndromes neovasculares intraoculares (tales como retinopatías proliferativas o degeneración macular relacionada con la edad (AMD)), artritis reumatoide y 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, G. K. (eds.), 2ª edición, Marcel Dekker, Nueva York (1994), pp 1625-1710).

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, mencionados anteriormente, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede proporcionarse absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y 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, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad de principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleados, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y el historial médico previo del paciente que se trate, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

Las composiciones deben ser estériles y fluidas en la medida en que la composición sea suministrable por jeringa. Además de agua, el vehículo preferentemente es una solución salina tamponada isotónica.

5 Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol y cloruro sódico en la composición.

10 Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable y todas estas designaciones incluyen descendencia. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica con respecto a la que se exploraba en la célula transformada originalmente.

15 Cuando se entiendan designaciones distintas, resultará evidente a partir del contexto.

El término "transformación" como se usa en el presente documento se refiere al proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico a una célula hospedadora. Si se usan células sin barreras de pared celular formidables como células hospedadoras, se lleva a cabo transfección por ejemplo mediante el método de precipitación de fosfato cálcico como se describe en Graham, F.L., y van der Eb, *Virology* 52 (1973) 456-467. Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en células tales como por inyección nuclear o por fusión de protoplastos. Si se usan células procariotas o células que contienen construcciones de pared celular sustanciosas, por ejemplo un método de transfección es el tratamiento con calcio usando cloruro cálcico como se describe en Cohen, F. N., *et al*, *PNAS*. 69 (1972) 711 Off.

25 Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso por el que un ácido nucleico se transcribe a ARNm y/o al proceso por el que el ARNm transcrito (también denominado transcrito) se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente producto génico. Si el polinucleótido deriva de ADN genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir corte y empalme del ARNm.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular auto-replicativa, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células hospedadoras. El término incluye vectores que actúan principalmente para inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo, integración cromosómica), replicación de vectores que actúan principalmente para la replicación de ADN o ARN, y vectores de expresión que actúan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. 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 hospedadora apropiada pueden transcribirse y traducirse a un polipéptido. Un "sistema de expresión" habitualmente se refiere a una célula hospedadora adecuada que comprende un vector de expresión que puede actuar para producir un producto de expresión deseado.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar al entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

45 Descripción de las secuencias de aminoácidos

SEC ID N°: 1	CDR3 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEC ID N°: 2	CDR2 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06
50 SEC ID N°: 3	CDR1 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEC ID N°: 4	CDR3 de cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEC ID N°: 5	CDR2 de cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEC ID N°: 6	CDR1 de cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEC ID N°: 7	dominio variable de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC06
55 SEC ID N°: 8	dominio variable de cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEC ID N°: 9	CDR3 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEC ID N°: 10	CDR2 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEC ID N°: 11	CDR1 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEC ID N°: 12	CDR3 de cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07
60 SEC ID N°: 13	CDR2 de cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEC ID N°: 14	CDR1 de cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEC ID N°: 15	dominio variable de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEC ID N°: 16	dominio variable de cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEC ID N°: 17	CDR3 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08
65 SEC ID N°: 18	CDR2 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08
SEC ID N°: 19	CDR1 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08

	SEC ID N°: 20	CDR3 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEC ID N°: 21	CDR2 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEC ID N°: 22	CDR1 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEC ID N°: 23	dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC08
5	SEC ID N°: 24	dominio variable de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEC ID N°: 25	CDR3 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEC ID N°: 26	CDR2 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEC ID N°: 27	CDR1 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEC ID N°: 28	CDR3 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09
10	SEC ID N°: 29	CDR2 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEC ID N°: 30	CDR1 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEC ID N°: 31	dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEC ID N°: 32	dominio variable de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEC ID N°: 33	CDR3 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10
15	SEC ID N°: 34	CDR2 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEC ID N°: 35	CDR1 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEC ID N°: 36	CDR3 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEC ID N°: 37	CDR2 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEC ID N°: 38	CDR1 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10
20	SEC ID N°: 39	dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEC ID N°: 40	dominio variable de cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEC ID N°: 41	CDR3 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEC ID N°: 42	CDR2 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEC ID N°: 43	CDR1 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
25	SEC ID N°: 44	CDR3 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEC ID N°: 45	CDR2 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEC ID N°: 46	CDR1 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEC ID N°: 47	dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEC ID N°: 48	dominio variable de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11
30	SEC ID N°: 49	CDR3 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEC ID N°: 50	CDR2 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEC ID N°: 51	CDR1 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEC ID N°: 52	CDR3 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEC ID N°: 53	CDR2 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
35	SEC ID N°: 54	CDR1 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEC ID N°: 55	dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEC ID N°: 56	dominio variable de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEC ID N°: 57	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1
	SEC ID N°: 58	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG4
40	SEC ID N°: 59	región constante de cadena ligera kappa
	SEC ID N°: 60	región constante de cadena ligera lambda
	SEC ID N°: 61	Receptor de Tie-2 humano
	SEC ID N°: 62	Angiopoyetina-2 (ANG-2) humana con líder y marcador His
	SEC ID N°: 63	Angiopoyetina-1 (ANG-1) humana con líder y marcador His

45	<u>Descripción de las Figuras</u>	
	Figura 1	Clonación de IgG para expresiones transitorias de vectores de expresión A) Ang2i-LC06 (Fig 1A) B.) Ang2i-LC06 (Fig 1B)
50	Figura 2	Gel de SDS-PAGE de anticuerpos anti ANG-2 purificados Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 y Ang2k-LC08
	Figure 3	ELISA de interacción de Angiopoyetina-Tie2
	Figure 4	Inhibición de la unión de ANG-2 con Tie2 por Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08
	Figure 5	Inhibición de la unión de ANG-1 con Tie2 por Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08
55	Figura 6	Modelo de xenoinjerto de Colo205 para ensayar la eficacia <i>in vivo</i> de los anticuerpos anti ANG-2
	Figura 7	Modelo de xenoinjerto de KPL4 para ensayar la eficacia <i>in vivo</i> de los anticuerpos anti ANG-2
	Figura 8	Prevención de ANG-1 mediante el sensograma de Biacore.
	Figura 9	Unión de metástasis/tumores secundarios de pulmón por los anticuerpos de acuerdo con la invención en xenoinjerto de tumor de colon primario (9A) y xenoinjerto de mama primario (9B)
60	Figura 10	Inhibición de tetinopatía por los anticuerpos de acuerdo con la invención.

Procedimiento Experimental 1

Materiales y métodos generales

65 Se proporciona información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas en: Kabat, E.A., *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 anticuerpos se enumeran y se denominan de acuerdo con la numeración de EU (Edelman, G.M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).

5

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos convencionales para manipular el ADN 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 usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10

Síntesis génica

Se prepararon segmentos génicos deseados a partir de oligonucleótidos preparados por síntesis química. Los segmentos génicos, que estaban flanqueados por sitios de escisión por endonucleasas de restricción singulares, se ensamblaron por hibridación y ligamiento de oligonucleótidos incluyendo amplificación por PCR y posteriormente se clonaron mediante 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 ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmaron por secuenciación de ADN. Los fragmentos de síntesis génica se encargaron de acuerdo con especificaciones dadas en Genearth (Ratisbona, Alemania).

15

20

Determinación de secuencia de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron por secuenciación bicatenaria realizada en MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemania).

25

Análisis de secuencia de ADN y proteínas y control de datos de secuencia

Se usó el paquete de software de GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) versión 10.2 y el grupo de programas Vector NT1 Advance de Infomax versión 8.0 para creación, mapeo, análisis, anotación e ilustración de secuencias.

30

Vectores de expresión

Para la expresión de los anticuerpos descritos se aplicaron variantes de plásmidos de expresión para expresión transitoria (por ejemplo en células HEK293 EBNA o HEK293-F) o para expresión estable (por ejemplo en células CHO) basada en una organización de ADNc con un promotor de Intrón A de CMV o en una organización genómica con un productor de CMV (por ejemplo Figura 1).

35

40

Además del casete de expresión de anticuerpo los vectores contenían:

- un origen de replicación que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
- un gen de β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

45

La unidad de transcripción del gen de anticuerpo está compuesta de los siguientes elementos:

- un sitio o sitios de restricción únicos en el extremo 5'
- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano,
- seguido de la secuencia de Intrón A en el caso de la organización de ADNc,
- una región no traducida 5' de un gen de anticuerpo humano,
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina
- la cadena de anticuerpo humano (cadena pesada, cadena pesada modificada o cadena ligera) bien como ADNc o bien como organización genómica con la organización exón-intrón de inmunoglobulina.
- una región no traducida 3' con una secuencia señal de poliadenilación, y
- un sitio o sitios de restricción únicos en el extremo 3'

50

55

60

Los genes de fusión que comprenden las secuencias de cadena pesada del anticuerpo seleccionado como se describen posteriormente se generaron por PCR y/o síntesis génica y se ensamblaron con métodos y técnicas

65

recombinantes conocidos por conexión de los segmentos de ácido nucleico acordes por ejemplo, usando sitios NsiI y EcoRI únicos en los vectores de cadena pesada genómicos. Las secuencias de ácido nucleico subclonados se verificaron por secuenciación de ADN. Para transfecciones transitorias y estables se prepararon mayores cantidades de los plásmidos por preparación de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Técnicas de cultivo celular

Se usaron técnicas de cultivo celular convencionales como se describen en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Transfecciones transitorias en sistema HEK293-F

Se generaron anticuerpos por transfección transitoria de los dos plásmidos que codificaban la cadena pesada o pesada modificada, respectivamente y la cadena ligera correspondiente usando el sistema HEK293-F (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se transfectaron células HEK293-F (Invitrogen) que crecían en suspensión bien en un matraz de agitación o en un fermentador agitado en medio de expresión sin suero FreeStyle 293 (Invitrogen) con una mezcla de los dos plásmidos de expresión respectivos y 293 fectina o fectina (Invitrogen). Para por ejemplo un matraz de agitación de 2 l (Coming) se sembraron células HEK293-F a una densidad de $1,0 \cdot 10^6$ células/ml en 600 ml y se incubó a 120 rpm, CO₂ 8 %. Al día siguiente las células se transfectaron a una densidad celular de aproximadamente $1,5 \cdot 10^6$ células/ml con aproximadamente 42 ml de mezcla de A) 20 ml de Opti.MEM (Invitrogen) con 600 µg de ADN plasmídico total (1 µg/ml) que codifica la cadena pesada o pesada modificada, respectivamente y la cadena ligera correspondiente en una relación equimolar y B) 20 ml de Opti-MEM + 1,2 ml de 293 fectina o fectina (2 µl/ml). De acuerdo con el consumo de glucosa se añadió solución de glucosa durante el transcurso de la fermentación. El sobrenadante que contenía el anticuerpo secretado se recogió después de 5-10 días y los anticuerpos se purificaron directamente del sobrenadante o el sobrenadante se congeló y se almacenó.

Determinación de proteínas

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

Determinación de la concentración de anticuerpos en sobrenadantes

La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se estimó por inmunoprecipitación con perlas de Agarosa de Proteína A (Roche). Se lavan 60 µl de perlas de Agarosa de Proteína A tres veces en TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 1 %). Posteriormente, se aplican 1-15 ml de sobrenadante de cultivo celular a las perlas de Agarosa de Proteína A pre-equilibradas en TBS-NP40. Después de incubación durante 1 h a temperatura ambiente las perlas se lavan en una columna de filtro Ultrafree-MC (Amicon) una vez con 0,5 ml de TBS-NP40, dos veces con 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato 2 x (PBS 2x, Roche) y brevemente cuatro veces con 0,5 ml de citrato sódico 100 mM, pH 5,0. El anticuerpo unido se eluye por adición de 35 µl de tampón de muestras LDS NuPAGE® (Invitrogen). La mitad de la muestra se combina con agente reductor de muestras NuPAGE® o se deja sin reducir, respectivamente, y se calienta durante 10 min a 70 °C. Posteriormente, se aplican 20 µl a un SDS-PAGE Bis-Tris NuPAGE® 4-12 % (Invitrogen) (con tampón MOPS para SDS-PAGE no reducido y tampón MES con aditivo de tampón de procesamiento antioxidante NuPAGE® (Invitrogen) para SDS-PAGE reducido) y se tiñó con Azul de Coomassie.

La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se midió por cromatografía de proteína A-HPLC. Brevemente, se aplicaron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos y derivados que se unían con Proteína A a una columna de Proteína A HiTrap (Ge Healthcare) en K₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,3 y se eluyeron de la matriz con ácido acético 50 mM, pH 2,5, en un sistema de HOPLC de Dionex. La proteína eluida se cuantificó por absorbancia de UV e integración de áreas máximas. Un anticuerpo IgG1 convencional purificado actuó como un patrón.

Como alternativa, se midió la concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular por ELISA de IgG de tipo sándwich. Brevemente se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos de Estreptavidina A de Alta Unión StreptaWell (Roche) con molécula de captura anti-IgG humana biotinilada F(ab')₂-h-Fcγ_{B1} (Dianova) 100 µl/pocillo a 0,1 µg/ml durante 1 h a temperatura ambiente o como alternativa durante una noche a 4 °C y posteriormente se lavaron tres veces con PBS 200 µl/pocillo, Tween 0,05 % (PBST, Sigma). Se añadieron 100 µl/pocillo de una serie de diluciones en PBS (Sigma) de los sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos respectivos a los pocillos y se incubaron durante 1-2 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con PBST 200 µl/pocillo y se detectó anticuerpo unido con 100 µl de F(ab')₂-h-Fcγ_{B1}-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 retiró por lavado tres veces con PBST 200 μ l/pocillo y se detectó el anticuerpo de detección unido mediante adición de 100 μ l de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se realizó en un Espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

5

Purificación de proteínas

Las proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados haciendo referencia a protocolos convencionales. Brevemente, se aplicaron anticuerpos a una columna de Proteína A Sepharose (GE Healthcare) y se lavaron con PBS. Se consiguió elución de anticuerpos a pH ácido seguido de neutralización inmediata de la muestra. Se separó proteína agregada de anticuerpos monoméricos por cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) en Histidina 20 mM, NaCl 140 mM pH 6,0. Las fracciones de anticuerpos monoméricas se agruparon, se concentraron si se requería usando por ejemplo un concentrador de centrifuga Amicon Ultra MILLIPORE (30 MWCO) y se almacenaron a -80 °C. Parte de las muestras se proporcionaron para análisis proteicos posteriores y caracterización analítica por ejemplo por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño, espectrometría de masas y determinación de Endotoxinas (véase Figura 2).

10

15

SDS-PAGE

El sistema de gel Pre-Moldeado NuPAGE® (Invitrogen) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usaron geles Pre-moldeados de TRIS-Glicina NuPAGE® Novex® 4-20 % y un tampón de ejecución de TRIS-Glicina SDS Novex® (véase por ejemplo Figura 1). Se consiguió reducir las muestras añadiendo agente reductor de muestras NuPAGE® antes de procesar el gel.

20

25 Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

Se analizó cromatografía de exclusión por tamaño para la determinación del estado de agregación y oligomérico de los anticuerpos por cromatografía de HPLC. Brevemente, se aplicaron anticuerpos purificados con Proteína A a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 7,5 en un sistema de Dionex HPLC o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en PBS 2 x en un sistema de HPLC Dionex. La proteína eluida se cuantificó por absorbancia de UV e integración de áreas máximas. El Patrón de Filtración en Gel de BioRad 151-1901 sirvió como patrón.

30

Espectrometría de masas

La masa desglucosilada total de anticuerpos se determinó y se confirmó mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS). Brevemente, se desglucosilaron 100 μ g de anticuerpos purificados con 50 mU de N-Glucosidasa F (PNGasaF, ProZyme) en KH₂PO₄/K₂HPO₄ 100 mM, pH 7 a 37 °C durante 12-24 h a una concentración proteica de hasta 2 mg/ml y posteriormente se desalaron mediante HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa de las cadenas pesada y ligera respectivas se determinó por ESI-MS después de desglucosilación y reducción. Brevemente, se incubaron 50 μ g de anticuerpo en 115 μ l con 60 μ l de TCEP 1 M y 50 μ l de clorhidrato de Guanidinio 8 M posteriormente desalado. La masa total y la masa de las cadenas pesada y ligera reducidas se determinaron mediante ESI-MS en un sistema Q-Star Elite MS equipado con una fuente NanoMate.

35

40

45

ELISA de unión a ANG-1 y ANG-2

Las propiedades de unión de los anticuerpos dirigidos contra ANGPT (Angiopoyetina 1 o 2) se evaluaron en un ensayo de ELISA con proteína de Angiopoyetina-2-His de longitud completa (R&D Systems N° 623-AN/CF o material producido de forma interna) o Angiopoyetina-1-His (R&D systems N° 923-AN). Por lo tanto, se recubrieron placas de 96 pocillos (placas de microtitulación potenciadas transparentes de poliestireno Falcon o Nunc Maxisorb) con 100 μ l de Angiopoyetina-1 o Angiopoyetina-2 humana recombinante 1 μ g/ml (sin vehículo) en PBS (Sigma) durante 2 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST (Tween 20 0,2 %) 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 añadieron 100 μ l/pocillo de una serie de diluciones (40 pM-0,01 pM) de anticuerpo de ensayo purificado contra <ANG-2> y como referencia Mab536 (Oliner, J., *et al.*, Cancer Cell. 6 Nov (2004) 507-16, documento US 2006/0122370) en PBS a los pocillos 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 se detectó anticuerpo unido con 100 μ l/pocillo de F(ab')₂-hK-POD 0,1 μ g/ml (Biozol Cat. N° 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 retiró por lavado tres veces con PBST 300 μ l/pocillo y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 μ l de ABTS/pocillo. Se realizó determinación de la absorbancia en un espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

50

55

60

65

BIACORE de unión a ANG-2

Se investigó la unión de los anticuerpos con el antígeno por ejemplo ANG-2 humana mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Brevemente, para mediciones de afinidad se inmovilizaron anticuerpos policlonales de cabra <hlgG-Fcγ< en una microplaca CM4 mediante acoplamiento de amina para presentación de los anticuerpos contra ANG-2 humana. La unión se midió en tampón de HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 %, pH 7,4), 25 °C. Se añadió ANG-2-His purificada (R&D systems o purificada de forma interna) en diversas concentraciones entre 0,41 nM y 200 nM en solución. La asociación se midió por una inyección de ANG-2 de 3 minutos; la disociación se midió lavando la superficie de microplaca con tampón de HBS durante 5 minutos y se estimó un valor de KD usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. Debido a la heterogeneidad de la preparación de ANG-2 no pudo observarse ninguna unión 1:1; los valores de KD son por lo tanto solamente estimaciones relativas. Se restaron datos de control negativo (por ejemplo curvas de tampón) a partir de curvas de muestras para corrección de la deriva de la línea basal intrínseca al sistema y para reducción de la señal de ruido. Se usó Software Biacore T100 Evaluation versión 1.1.1 para análisis de sensores y para cálculo de datos de afinidad. Como alternativa, podría capturarse ANG-2 con un nivel de captura de 2000-1700 UR mediante un Anticuerpo PentaHis (PentaHis-Ab sin BSA, Qiagen N° 34660) que se inmovilizó en una microplaca CM5 mediante acoplamiento de amina (sin BSA) (véase posteriormente).

20 Inhibición de la unión de huANG-2 con Tie-2 (ELISA)

La ELISA de interacción se realizó en placas de microtitulación de 384 pocillos (MicroCoat, DE, Cat. N° 464718) a TA. Después de cada etapa de incubación las placas se lavaron 3 veces con PBST. Las placas de ELISA se recubrieron con proteína Tie-2 0,5 µg/ml (R&D Systems, Reino Unido, Cat. N° 313-TI) durante al menos 2 horas (h). A continuación los pocillos se bloquearon con PBS complementado con Tween-20 0,2 % y BSA 2 % (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 1 h. Se incubaron diluciones de anticuerpos purificados en PBS junto con huAngiopoyetina-2 0,2 µg/ml (R&D Systems, Reino Unido, Cat. N° 623-AN) durante 1 hora a TA. Después de lavar se añadió una mezcla de clon anti-Angiopoyetina-2 BAM0981 biotinilado 0,5 µg/ml (R&D Systems, Reino Unido) y estreptavidina HRP diluida 1:3000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat. N° 11089153001) durante 1 h. A continuación las placas se lavaron 8 veces con PBST. Las placas se revelaron con reactivo de ABTS recién preparado (Roche Diagnostics GmbH, DE, N° de tampón 204 530 001, comprimidos N° 11 112 422 001) durante 30 minutos a TA. La absorbancia se midió a 405 nm.

35 Inhibición de la unión de huANG-1 con Tie-2 (ELISA)

Se realizó ELISA de interacción en placas de microtitulación de 384 pocillos (MaxiSorb Nunc N° 442768) a TA. Después de etapa de incubación las placas se lavaron 3 veces con PBST. Se recubrieron placas de ELISA con proteína de Tie-2 0,5 µg/ml (R&D Systems, Reino Unido, Cat. N° 313-TI o material producido de forma interna) durante al menos 2 horas (h). A continuación los pocillos se bloquearon con PBS complementado con Tween-20 0,2 % y BSA 2 % (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 1 h. Se incubaron diluciones de anticuerpos purificados en PBS junto huAngiopoyetina-1 0,2 µg/ml (R&D Systems N° 923-AN/CF o material producido de forma interna) durante 1 h a TA. Después de lavar se añadió una mezcla de clon anti-Angiopoyetina-1 biotinilado 0,5 µg/ml (R&D Systems N° BAF293) y estreptavidina HRP diluida 1:3000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat. N° 11089153001) durante 1 h. A continuación las placas se lavaron 6 veces con PBST. Las placas se revelaron con reactivo ABTS recién preparado (Roche Diagnostics GmbH, DE, tampón N° 204 530 001, comprimidos N° 11 112 422 001) durante 30 minutos a TA. La absorbancia se midió a 405 nm.

Generación de la línea celular HEK293-Tie2

Para determinar la interferencia de anticuerpos de Angiopoyetina-2 con fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 y unión de ANGPT2 con Tie2 en células se generó una línea celular HEK293-Tie recombinante. Brevemente se transfeció un plásmido basado en pcDNA3 (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) que codificaba Tie2 humana de longitud completa (SEC ID 61) bajo el control de un promotor de CMV y un marcador de resistencia a Neomicina usando Fugene (Roche Applied Science) como reactivo de transfección en células HEK293 (ATCC) y se seleccionaron células resistentes en DMEM FCS 10 %, G418 500 µg/ml. Se aislaron clones individuales mediante un cilindro de clonación, y posteriormente se analizaron con respecto a expresión de Tie2 por FACS. Se identificó el clon 22 como el clon con expresión de Tie2 alta y estable incluso en ausencia de G418 (clon 22 de HEK293-Tie2). El clon 22 de HEK293-Tie2 se usó posteriormente para ensayos celulares: fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT2 y ensayo de unión de ligando celular ANGPT2.

60 Ensayo de fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT2

La inhibición de la fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT2 mediante anticuerpos de ANGPT2 se midió de acuerdo con el siguiente principio de ensayo. El clon 22 de HEK293-Tie se estimuló con ANGPT2 durante 5 minutos en ausencia o presencia de anticuerpo de ANGPT2 y se cuantificó P-Tie2 por un ELISA de tipo sándwich.

Brevemente, se cultivaron 2×10^5 células del clon 22 de HEK293-Tie-2 por pocillo durante una noche en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con Poli-D-Lisina en 100 μ l de DMEM, FCS 10 %, Geneticina 500 μ g/ml. Al día siguiente se preparó una fila de valoración de anticuerpos de ANGPT2 en una placa de microtitulación (concentrada 4 veces, 75 μ l de volumen final/pocillo, duplicados) y se mezcló con 75 μ l de una dilución de ANGPT2 (R&D systems N° 623-AN) (3,2 μ g/ml como solución concentrada 4 veces). Se pre-incubaron anticuerpos y ANGPT2 durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μ l de la mezcla a las células del clon 22 de HEK293-Tie-2 (pre-incubadas durante 5 minutos con NaV3O4 1 mM, Sigma N° S6508) y se incubaron durante 5 min a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron con 200 μ l de PBS helado + NaV3O4 1 mM por pocillo y se lisaron mediante la adición de 120 μ l de tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 137 mM, NP-40 1 %, glicerol 10 %, EDTA 2 mM, NaV3O4 1 mM, PMSF 1 mM y Aprotinina 10 μ g/ml) por pocillo en hielo. Las células se lisaron durante 30 min a 4 °C en un agitador de placa de microtitulación y se transfirieron 100 μ l de lisado directamente a una placa de microtitulación de ELISA de p-Tie2 (R&D Systems, R&D N° DY990) sin centrifugación previa y sin determinación de proteínas totales. Las cantidades de P-Tie2 se cuantificaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los valores de CI50 para inhibición se determinaron usando el complemento de análisis XLfit4 para Excel (modelo de un sitio de respuesta a dosis 205). Los valores de CI50 pueden compararse dentro del experimento pero podrían variar entre experimentos.

Ensayo de fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT1

Se midió la inhibición de la fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT1 por anticuerpos de ANGPT1 de acuerdo con el siguiente principio de ensayo. Se estimuló el clon 22 de HEK293-Tie2 con ANGPT1 durante 5 minutos en ausencia o presencia de anticuerpo de ANGPT1 y se cuantificó P-Tie2 por un ELISA de tipo sándwich. Brevemente, se cultivaron 2×10^5 células del clon 22 de HEK293-Tie2 por pocillo durante una noche en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta por Poli-D-Lisina en 100 μ l de DMEM, FCS al 10 %, Geneticina 500 μ g/ml. Al día siguiente se preparó una fila de valoración de anticuerpos de ANGPT1 en una placa de microtitulación (concentrado 4 veces, 75 μ l de volumen final/pocillo, duplicados) y se mezcló con 75 μ l de una dilución de ANGPT1 (R&D systems N° 923-AN) (0,8 μ g/ml como una solución concentrada 4 veces). Se preincubaron anticuerpos de ANGPT1 durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μ l de la mezcla a las células del clon 22 de HEK293-Tie2 (preincubadas durante 5 min con NaV3O4 1 mM, Sigma N° S6508) y se incubaron durante 5 min a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron con 200 μ l de PBS helado + NaV3O4 1 mM por pocillo y se lisaron mediante la adición de 120 μ l de tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 137 mM, NP-40 1 %, glicerol 10 %, EDTA 2 mM, NaV3O4 1 mM, PMSF 1 mM y Aprotinina 10 μ g/ml) por pocillo en hielo. Las células se lisaron durante 30 min a 4 °C en un agitador de placas de microtitulación y se transfirieron 100 μ l de lisado directamente a una placa de microtitulación de ELISA de p-Tie2 (R&D Systems, R&D N° DY990) sin centrifugación previa y sin determinación de proteínas totales. Las cantidades de P-Tie2 se cuantificaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se determinaron los valores de CI50 para inhibición usando el complemento de análisis XLfit4 para Excel (modelo de un sitio de respuesta a dosis, 205). Los valores CI50 pueden compararse dentro de un experimento pero podrían variar entre experimentos.

40 Ejemplo 1

Expresión y purificación de los anticuerpos de <ANG-2> monoclonales Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 y Ang2k-LC08

Se construyeron cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos correspondientes Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 y Ang2k-LC08 en vectores de expresión como se ha descrito anteriormente. La cadena pesada y la ligera kappa se clonaron en un casete de expresión genómica, mientras que la cadena ligera lambda se clonó como ADNc con el intrón A (Fig. 1B). Los plásmidos se amplificaron en *E. coli*, se purificaron y posteriormente se transfectaron para expresión transitoria de proteínas recombinantes en células HEK293-F (utilizando el sistema FreeStyle 293 de Invitrogen). Después de 7 días, se recogieron los sobrenadantes de células HEK293-F, se filtraron y los anticuerpos se purificaron por proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. La homogeneidad de todos los anticuerpos se confirmó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras y cromatografía de exclusión por tamaño analítica. En condiciones reductoras (Figura 1), las cadenas pesadas polipeptídicas de anticuerpos de <ANG-2> mostraron tras SDS-PAGE tamaños moleculares aparentes de aproximadamente 50 kDa análogos de los pesos moleculares calculados, las cadenas ligeras polipeptídicas mostraron masas moleculares aparentes de 25 kDa de acuerdo con su tamaño predicho. La espectrometría de masas confirmó la identidad de los anticuerpos purificados. Los niveles de expresión de todas las construcciones se analizaron por HPLC de Proteína A.

60 Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño de los purificados. Todos los anticuerpos se prepararon y se caracterizaron analíticamente de forma análoga al procedimiento descrito. Los datos SEC de los anticuerpos correspondientes se han resumido en la siguiente tabla.

	Cadena de anticuerpo	Masa teórica (Da)	Masa experimental (Da)	Pico principal de SEC (%)
<ANG-2>Ang-2i_LC07	HC	50343	50325 (piro-Glu)	99,7 %
	LC	22738	22720 (piro-Glu)	
<ANG-2>Ang-2i_LC06	HC	50343	50325 (piro-Glu)	99,8 %
	LC	22620	22605 (piro-Glu)	
<ANG-2>Ang-2k_LC08	HC	49544	49527 (piro-Glu)	99,8 %
	LC	22685	22667 (piro-Glu)	

Ejemplo 2

5 Ensayo de unión de ELISA para ANG1 humana y para ANG-2 humana

La unión de los anticuerpos de <ANG-2> Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 y Ang2k-LC08 con ANG-1 humana y ANG-2 humana se determinó en un ELISA de unión a ANG-1 o ANG-2 como se ha descrito anteriormente. Brevemente, el ensayo de tipo ELISA se basa en la inmovilización de Angiopoyetina-1 o 2 de tipo silvestre humana en una placa de microtitulación. La unión de un anticuerpo dirigido contra la ANG-1 o ANG-2 inmovilizada se mide mediante un anticuerpo de <Fc humano> (anti-IgG) con un conjugado de POD. Una serie de diluciones del anticuerpo de <ANG-2> permite determinar una concentración CE50. Se usó como referencia el anticuerpo anti-ANG-2 humano anticuerpo de <ANG-2> Mab536 (Oliner *et al.*, Cancer Cell. 6 nov (2004) 507-16, documento US 2006/0122370). Las concentraciones CE50 determinadas se resumen en la siguiente tabla.

15

Anticuerpo	CE50 de unión a hANG-1	CE50 de unión a hANG-2
<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

20

Todos los anticuerpos se unen específicamente con ANG-2. Mab536 y Ang2k-LC08 también muestran unión específica para ANG-1, mientras que Ang2i-LC06 y Ang2i-LC07 no se unen específicamente con ANG-1 ya que tienen un valor de CE50 mayor de 8000 ng/ml (límite de detección).

Ejemplo 3:

Unión con ANG-2 mediante Biacore

25

La afinidad de unión con ANGPT2 humano se examinó con un ensayo de Biacore como se ha descrito anteriormente. Brevemente, en este ensayo se inmoviliza un anticuerpo de captura (anti-Fc) en la superficie de la microplaca de Biacore, que captura y presenta el anticuerpo correspondiente (por ejemplo Ang2i-LC06). El ligando (aquí ANGPT2) se captura de una solución. La afinidad para esta interacción se determina con la suposición de una interacción 1:1. Pueden encontrarse detalles de este experimento en la sección de métodos general. Las afinidades determinadas para unión con ANGPT2 (KD) se resumen en la siguiente tabla.

30

hAng-2	Experimento 1			Experimento 2			Promedio (de 1+2)	t _{(1/2)dis} (min)
	KD (pM)	kd (1/s)	t _{(1/2)dis} (min)	KD (pM)	kd (1/s)	t _{(1/2)dis} (min)		
Ang2i-LC06	11	7,16E-05	161	21	1,14E-04	102	16	132
Ang2k-LC08	16	1,61E-04	72	27	2,28E-04	51	22	61
Mab536	29	1,44E-04	80	29	1,25E-04	92	29	86

Los anticuerpos Ang2i-LC06 y Ang2k se unen con alta afinidad con ANGPT2.

35

Ejemplo 4:

Neutralización de la interacción de ANGPT1/2-Tie2 (humana)

Se ha mostrado el bloqueo de la interacción de ANGPT1/2 humana/Tie2 por ELISA de interacción del receptor. Se recubrieron placas Maxisorp de 384 pocillos (Nunc) con Tie2 humana 0,5 µg/ml (R&D Systems, UK, Cat. Nº 313-T1 o material producido de forma interna) durante 2 h a temperatura ambiente y se bloqueó con PBS complementado con Tween-20 0,2 % y BSA 2 % (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación.

5 Mientras tanto, se incubaron diluciones de anticuerpos purificados en PBS junto con huAngiopoyetina-1/2 0,2 µg/ml (R&D Systems Nº 923-AN/CF, R&D Systems, Reino Unido, Cat. Nº 623-AN o material producido de forma interna) durante 1 h a TA. Después de lavar se añadió una mezcla de clon anti-Angiopoyetina-1/2 biotinilado 0,5 µg/ml (R&D Systems Nº BAF923, BAM0981 R&D Systems, Reino Unido) y estreptavidina HRP diluida 1:3000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat. Nº 11089153001) durante 1 h. A continuación las placas se lavaron 6 veces con PBST.

10 Las placas se revelaron con reactivo ABTS recién preparado (Roche Diagnostics GmbH, DE, tampón Nº 204 530 001, comprimidos Nº 11 112 422 001) durante 30 minutos a TA. La absorbancia se midió a 405 nm.

Las concentraciones inhibitoras obtenidas se resumen en la siguiente tabla.

Anticuerpo	ELISA de interacción de ANGPT1/Tie2	ELISA de interacción de ANGPT2/Tie2
Ang2i-LC06	> 100 nM	0,1 nM
Ang2k-LC08	11 nM	0,17 nM
MAB536	n.d.	0,15 nM

15 La tabla anterior muestra diferentes perfiles de selectividad para los dos anticuerpos Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08. Ang2i-LC06 es selectivo de ANGPT2, mientras que Ang2k-LC08 tiene reacción cruzada con ANGPT1/2 en la inhibición de la interacción de ANGPT1/2 Tie2.

20 Ejemplo 5:

Fosforilación de Tie2

La capacidad de los anticuerpos de ANGPT2 identificados para interferir con la fosforilación de Tie2 mediada por ANGPT2 y ANGPT1 se examinó en los ensayos de fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT2 y ANGPT1 como se ha descrito anteriormente. Se presenta una representación esquemática de la preparación de ensayo en la Figura 3.

30 Ambos anticuerpos Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 mostraron una interferencia dependiente de dosis con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 como se muestra en la Figura 4 con valores de CI50 comparables. Ang2i-LC06 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de aproximadamente 508 ng/ml y Ang2k-LC08 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de aproximadamente 499 ng/ml. Por el contrario, solamente Ang2k-LC08 interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 con un valor de CI50 de aproximadamente 391 ng/ml mientras que Ang2i-LC06 no interfirió con la fosforilación de Tie2 estimulada por ANGPT2 en el mismo intervalo de concentraciones ensayado (Figura 5).

35 Ejemplo 6: Eficacia *in vivo*

Efecto de anticuerpos anti ANGPT en el crecimiento de xenoinjerto Colo205

40 Eficacia *in vivo* de los anticuerpos de <ANGPT2> Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 en comparación con Mab536 <ANGPT2> en modelo de xenoinjerto Colo205 subcutáneo con etapa determinada.

Los anticuerpos Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 purificados se compararon con el anticuerpo Mab536 en el modelo de xenoinjerto Colo205 subcutáneo con etapa determinada (Ang2_PZ_Colo205_006) en ratones beige Scid hembra.

45 Anticuerpos: Mab536 se proporcionó como una solución madre congelada (c = 4,5 mg/ml), Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 se proporcionaron como solución madre congelada (c = 1 mg/ml) en Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. La solución de anticuerpo se diluyó de forma apropiada en PBS a partir de inyecciones previas de reserva cuando se requiriera y se aplicó PBS como vehículo. El anticuerpo anti-IgE IgG1 humanizado Xolair (Omalizumab) actuó como control positivo y se compró en una farmacia.

55 Líneas celulares y condiciones de cultivo: Se obtuvieron originalmente células cancerosas colorrectales humanas Colo205 de ATCC y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Penzberg de Roche. La línea celular tumoral se cultivó de forma rutinaria en medio RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Austria) complementado con suero bovino fetal al 10 % (PAA, Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM, a 37 °C en una atmósfera saturada de agua a CO2 5 %. Se usó pase 3 para trasplante.

60 Animales: Se mantuvieron ratones beige SCID hembra (obtenidos de Charles River Alemania) en condiciones sin patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con directrices comprometidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y se aprobó por el gobierno local.

Después de la llegada los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de la instalación animal durante una semana para que se acostumbraran a nuevo ambiente y para observación. Se llevó a cabo de control de la salud continuo regularmente. Se proporcionaron alimento dietético (Provimi Kliba 3337) y agua (pH ácido 2,5-3) a voluntad. La edad de los ratones al comienzo del estudio fue de aproximadamente 12-14 semanas.

5 Supervisión: Los animales se controlaron diariamente con respecto a síntomas clínicos y detección de efectos adversos. Para la supervisión en todo el experimento se documentó el peso corporal de los animales y se midió el volumen tumoral por calibrador después de su estadificación.

10 Inyección de células tumorales: El día de la inyección las células Colo205 se centrifugaron, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Después de un lavado adicional con PBS se determinaron la concentración celular y el tamaño celular usando un contador celular y sistema analizador (Vi-CELL, Beckman Coulter). Para la inyección de células Colo205, el título final se ajustó a $5,0 \times 10^7$ células/ml, viabilidad de aproximadamente el 90 %. Posteriormente se inyectaron 100 μ l de esta suspensión correspondientes a $2,5 \times 10^6$ células por animal s.c. en el flanco derecho de los ratones.

15 Tratamiento de los animales: El tratamiento de los animales comenzó el día de la distribución al azar, 16 días después del trasplante celular (Ang2_PZ_Colo205_006 del estudio) a un volumen tumoral medio de 178 mm³.

20 Programa de dosis de Ang2_PZ_Colo205_006 del estudio:

Grupo	Nº de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía/Modo de administración	Nº de tratamientos	Dosis acumulada (mg/kg)
1	10	Vehículo		i.p. una vez a la semana	5	
2	10	Xolair	10	i.p. una vez a la semana	5	50
3	10	Ang2i-LC06	10	i.p. una vez a la semana	5	50
5	10	Ang2k-LC08	10	i.p. una vez a la semana	5	50
6	10	MAB536	10	i.p. una vez a la semana	5	50

25 La inhibición del crecimiento tumoral hasta el Día 50 se muestra en la Figura 6. Los datos muestran que el anticuerpo selectivo de ANGPT2 ang2i-LC06 fue el anticuerpo más activo (valor de relación de control tumoral (TCR) valor 0,39). Ang2i-LC06 fue más eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral que el anticuerpo MAb536 (Valor de TCR 0,47) y el anticuerpo selectivo para ANGPT2, con reacción cruzada para ANGPT1 Ang2k-LC08 (valor de TCR 0,46).

30 Efecto de los anticuerpos anti ANGPT en el crecimiento de xenoinjerto de KPL-4

Eficacia *in vivo* de los anticuerpos de <ANGPT2> Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 en comparación con Mab536 de <ANGPT2> en modelo de xenoinjerto de KPL-4 ortotópico con etapa determinada.

35 Los anticuerpos Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 purificados se compararon con el anticuerpo Mab536 en el modelo xenoinjerto de KPL-4 ortotópico con etapa determinada (Ang2_PZ_KPL-4_002) en ratones beige Scid hembra.

40 Anticuerpos: Se proporcionó Mab536 como solución madre congelada (c = 4,5 mg/ml), Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 se proporcionaron como solución madre congelada (c = 1 mg/ml) en Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. La solución de anticuerpo se diluyó de forma apropiada en PBS a partir de inyecciones previas de reserva según se requiriera y se aplicó PBS como vehículo.

45 Líneas celulares y condiciones de cultivo: Se establecieron adicionalmente células de cáncer de mama humanas KPL-4 a partir de la efusión pleural maligna de un paciente con cáncer de mama con una metástasis de piel inflamatoria. Las células KPL-4 se proporcionaron amablemente por el Prof. J. Kurebayashi (Escuela Médica de Kawasaki, Kurashiki, Japón). Las células tumorales se cultivaron rutinariamente en medio DMEM (PAN Biotech, Alemania) complementado 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 a CO₂ 5 %. Se realizó pase de cultivo con tripsina / EDTA 1 x (PAN) dividiendo tres veces / semana.

50 Animales: se mantuvieron ratones beige SCID hembra (obtenidos de Charles River Alemania) en condiciones sin patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con directrices comprometidas

(GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y se aprobó por el gobierno local. Después de su llegada los animales se mantuvieron en la parte en cuarentena de la instalación animal durante una semana para que se acostumbraran al nuevo ambiente y para observación. Se llevó a cabo control de la salud continuo regularmente. Se proporcionó alimento dietético (Provimi Kliba 3337) y agua (pH ácido 2,5-3) a voluntad. La edad de los ratones al comienzo del estudio fue de aproximadamente 12 semanas.

Supervisión: los animales se controlaron diariamente con respecto a síntomas clínicos y detección de efectos adversos. Para la supervisión durante todo el experimento se documentó el peso corporal de los animales y se midió el volumen tumoral por calibrador después de su estadificación.

Inyección de células tumorales: el día de la inyección se recogieron células tumorales (tripsina-EDTA) de matraces de cultivo (Greiner TriFlask) y se transfirieron a 50 ml de medio de cultivo, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Después de una etapa de lavado adicional con PBS y filtración (filtro celular; Falcon™; 100 µm) el título celular final se ajustó a $1,5 \times 10^8$ /ml. La suspensión de células tumorales se mezcló cuidadosamente con pipeta de transferencia para evitar la agregación celular. Se realizó anestesia usando una unidad de inhalación de Stephens para animales pequeños con cámara de preincubación (plexiglás), máscara nasal de ratón individual (silicio) y compuesto de anestesia no inflamable o explosivo Isoflurano (Pharmacia-Upjohn, Alemania) en un sistema de circulación cerrada. Dos días antes de la inyección se afeitó el pelo de los animales. Para inyección i.m.f.p. las células se inyectaron de forma ortotópica a un volumen de 20 µl (3×10^6 /animal) en la penúltima almohadilla de grasa mamaria inguinal derecha de cada ratón anestesiado. Para la implantación ortotópica, la suspensión celular se inyectó a través de la piel bajo el pezón usando una jeringa de microlitros de Hamilton y una aguja 30Gx1,27 cm.

El tratamiento de los animales comenzó el día de la distribución al azar, variando los tumores de 60-180 mm³, 3,35 días después del trasplante celular (Ang2_PZ_KPL-4_002 del estudio) en un volumen tumoral medio de aproximadamente 90 mm³.

Programa de dosis de Ang2_PZ_KPL-4_002 del estudio:

Grupo	Nº de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía/Modo de administración	Nº de tratamientos	Dosis acumulada (mg/kg)
1	10	Vehículo		i.p. una vez por semana	5	
2	10	Xolair	10	i.p. una vez por semana	5	50
3	10	Ang2i-LC06	10	i.p. una vez por semana	5	50
5	10	Ang2k-LC08	10	i.p. una vez por semana	5	50
6	10	MAB536	10	i.p. una vez por semana	5	50

Se muestra la inhibición del crecimiento tumoral hasta el día 64 en la Figura 7. Los datos muestran que el anticuerpo selectivo de ANGPT2 Ang2i-LC06 fue el anticuerpo más activo (valor de TCR 0,55) en el modelo de KPL-4. Ang2i-LC06 fue más eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral que el anticuerpo MAb536 (valor de TCR 0,57) y el anticuerpo selectivo para ANGPT2, con reacción cruzada con ANGPT1 Ang2k-LC08 (valor de TCR 0,57).

Ejemplo 7:

Unión con ANG-1 mediante Biacore

La afinidad para unión con ANG-1 humana se examinó con un ensayo de Biacore: se inmovilizó huAng-1 en una microplaca biosensora CM5 usando química de acoplamiento de amina. La proteína se inyectó durante 20 minutos en acetato sódico pH 4,5 a 10 µg/ml a un caudal de 5 µl/min. Esto dio como resultado una densidad de superficie de aproximadamente 20000 UR. En la celda de flujo de referencia se inmovilizó BSA en las mismas condiciones. Los anticuerpos se diluyeron en HBS-P hasta 100 nM y se inyectaron durante 3 minutos (fase de asociación). Después de lavar con tampón de ejecución durante 3 minutos (fase de disociación), la superficie se regeneró inyectando hidróxido sódico 10 mM durante 1 min a 5 µl/min. Los resultados se muestran en la Figura 8: Ang2k_LC08 tuvo un tiempo medio de disociación de complejo de aproximadamente 50 s, Ang2i_LC06 de aproximadamente 5 s y Ang2i_LC10 no mostró unión con ANG-1.

Ejemplo 8: Prevención de metástasis/tumores secundarios *in vivo* en portadores de tumores primarios

a) Prevención de metástasis/secundarios en ratones con xenoinjertos de tumores Colo205 primarios

Líneas celulares y condiciones de cultivo:

Se obtuvieron originalmente células de cáncer colorrectal humano Colo205 de ATCC y después de su expansión se depositaron en el banco celular interno de Penzberg de Roche. La línea célula tumoral se cultivó rutinariamente en medio RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Austria) complementado con suero bovino fetal al 10 % (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua a CO₂ 5 %. Se usó pase 3 para trasplante.

Animales:

Se mantuvieron ratones beige SCID hembra; de edad 4-5 semanas a su llegada (obtenidos de Charles River Alemania) en condiciones sin patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con directrices comprometidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local. Después de su llegada los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de la instalación animal durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para observación. Se llevó a cabo control de la salud continuo regularmente. Se proporcionó alimento dietético (Provimi Kliba 3337) y agua (pH ácido 2,5-3) a voluntad. La edad de los ratones al comienzo del estudio fue de aproximadamente 10 semanas.

Inyección de células tumorales:

El día de la inyección, las células tumorales Colo205 se recogieron (tripsina-EDTA) de 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 una etapa adicional de lavado con PBS y filtración (filtro celular; Falcon Ø 100 µm) el título celular final se ajustó a 2,5 x 10⁷/ml. La suspensión de células tumorales se mezcló cuidadosamente con pipeta de transferencia para evitar la agregación celular. Después de esto, la suspensión celular se cargó en una jeringa de tuberculina de 1,0 ml (Braun Melsungen) usando 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 usó una nueva aguja. Se aplicó anestesia usando una unidad de inhalación Stephens para animales pequeños con cámara de preincubación (plexiglás), máscara nasal de ratón individual (silicio) y compuesto de anestesia no inflamable o explosivo Isoflurano (cp-pharma) en un sistema de circulación cerrada. Dos días antes de la inyección se afeitó el pelo de los animales y para inyección de células la piel de los animales anestesiados se elevó cuidadosamente con un fórceps anatómico y se inyectaron 100 µl de suspensión celular (=2,5 x 10⁶) por vía subcutánea en el flanco derecho de los animales. El crecimiento tumoral de los tumores primarios se controló (datos no mostrados).

Control de tumores secundarios por ejemplo en el pulmón por cuantificación de secuencias Alu humanas

Al terminar el estudio (día 103) los pulmones se recogieron de animales de todos los grupos. Brevemente, las muestras se transfirieron inmediatamente a nitrógeno líquido. En una etapa adicional se aisló ADN total de las muestras con el Instrumento MagNA Pure LC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron cebadores específicos de Alu humana para amplificación selectiva de secuencias Alu por PCR cuantitativa (Instrumento LightCycler). (T. Schneider *et al.*, Clin. Exp. Metas. 2002; 19: 571-582).

Tratamiento de los animales

El tratamiento de los animales con Avastin (10 mg/kg i.p. una vez por semana) se inició 14 días después del trasplante celular (Ang2_PZ_Colo205_008 del estudio) a un volumen tumoral medio de 340 mm³. Después de 7 semanas los ratones se distribuyeron al azar para el tratamiento secundario posterior comenzando el día 51 con compuestos enumerados en la siguiente tabla. Tratamiento secundario que comienza el día 51 de Ang2_PZ_Colo205_008 del Estudio.

Grupo	Nº de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía/Modo de administración	Nº de tratamientos	Dosis acumulada (mg/kg)
1	10	Avastin	10 mg/kg	i.p. una vez por semana	11	110
2	10	LC06 + Avastin	10 mg/kg 10 mg/kg	i.p. una vez por semana i.p. una vez por semana	6 11	60 110
3	10	LC06	10 mg/kg	i.p. una vez por semana	6	60

Los resultados de la prevención de metástasis/tumores secundarios (en el pulmón) se enumeran en la siguiente tabla y se muestran en la Figura 9A

Tabla 1: Cuantificación de ADN de ALU humana en los pulmones de ratones que portaban originalmente tumores Colo205 primarios, después del tratamiento con anticuerpos diferentes

	Avastin		Avastin + Ang2i-LC06		Ang2i_LC06	
	101	0,0264	201	0,0042	301	0,0047

	Avastin		Avastin + Ang2i-LC06		Ang2i_LC06	
	102	5,6740	202	0,0044	302	0,0055
	103	0,0307	203	0,0065	303	0,0050
	104	0,0203	204	0,0081	304	0,0064
	105	0,0215	205	0,0063	305	0,0062
	106	0,0338	206	0,0061	306	0,0066
	107	0,0075	207	0,0053	307	0,0250
	108	0,0113	208	0,0506	308	0,0062
	109	0,0087	209	0,0065	309	0,0067
	110	0,0587	210	0,0160	310	0,0064
media		0,5893		0,0114		0,0079
mediana		0,0240		0,0064		0,0063

Los resultados muestran una prevención claramente mejorada de tumores secundarios/metástasis por ANG2i-LC06 en comparación con Avastin

5 b) Prevención de la metástasis/secundario en ratones con xenoinjertos de tumores KPL-4 primarios

Línea celular tumoral

La línea celular de cáncer de mama humano KPL-4 (proporcionado amablemente por el Profesor J. Kurebayashi) se ha establecido a partir de la efusión pleural maligna de un paciente con cáncer de mama con una metástasis cutánea inflamatoria. Las células tumorales se cultivan rutinariamente en medio DMEM (PAN Biotech, Alemania) complementado 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 a CO₂ 5 %. Se realiza pase de cultivo con tripsina/EDTA 1 x (PAN) dividiendo tres veces / semana.

Ratones

Después de su llegada, se mantuvieron ratones beige SCID hembra (edad 10-12 semanas; peso corporal 18-20 g) Charles River, Sulzfeld, Alemania) en la parte en cuarentena de la instalación animal durante una semana para acostumbrarlos al nuevo ambiente y para observación. Se llevó a cabo control de la salud continuo. Los ratones se mantuvieron en condiciones de SPF de acuerdo con las directrices internacionales (GV-Solas; Felasa; TierschG) con ciclos diarios de 12 h de luz /12 h de oscuridad. Se proporcionó alimento dietético (Kliba Provimi 3347) y agua (filtrada) a voluntad. El protocolo del estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (Regierung von Oberbayern; nº de registro 211.2531.2-22/2003).

Inyección de células tumorales

El día de la inyección se recogieron células tumorales (tripsina-EDTA) de matraces de cultivo (Greiner TriFlask) y se transfirieron a 50 ml de medio de cultivo, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Después de una etapa de lavado adicional con PBS y filtración (filtro celular; Falcon Ø 100 µm) el título celular final se ajustó a 1,5 x 10⁸/ml. La suspensión celular tumoral se mezcló cuidadosamente con pipeta de transferencia para evitar la agregación celular. Se realizó anestesia usando una unidad de inhalación de Stephens para animales pequeños con cámara de preincubación (plexiglás), máscara nasal de ratón individual (silicio) y compuesto de anestesia no inflamable o explosivo Isoflurano (Pharmacia-Upjohn, Alemania) en un sistema de circulación cerrada. Dos días antes de la inyección se afeitó el pelo de los animales. Para inyección i.m.f.p. las células se inyectaron de forma ortotópica a un volumen de 20 µl en la penúltima almohadilla de grasa mamaria inguinal derecha de cada ratón anestesiado. Para el implante ortotópico, la suspensión celular se inyectó a través de la piel bajo el pezón usando una jeringa de microlitros de Hamilton y una aguja de 30Gx1,27 cm. Se controló el crecimiento tumoral de los tumores primarios (datos no mostrados).

Control de tumores secundarios por ejemplo en el pulmón por cuantificación de secuencias Alu humanas

Al terminar el estudio (día 103) se recogieron pulmones de animales de todos los grupos. Brevemente, se transfirieron muestras inmediatamente a nitrógeno líquido. En una etapa adicional se aisló el ADN total de las muestras con el Instrumento MagNA Pure LC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron

cebadores específicos de Alu humana para amplificación selectiva de secuencias Alu por PCR cuantitativa (Instrumento LightCycler). (T. Schneider *et al.*, Clin. Exp. Metas. 2002; 19: 571-582).

Tratamiento de los animales

- 5 El tratamiento de los animales se inició 35 días después del trasplante celular a un volumen tumoral medio de 60-160 mm³. Los compuestos y el programa de dosis se enumeran en la siguiente tabla.

Grupo	Nº de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía/Modo de administración	Nº de tratamientos	Dosis acumulada (mg/kg)
4	10	Vehículo		i.p. dos veces por semana	5	
5	10	Xolair	10	i.p. dos veces por semana	5	50
6	10	Ang2i_LC06	10	i.p. una vez por semana	4	40
7	10	Ang2i_LC07	10	i.p. una vez por semana	4	40
8	10	Ang2k_LC08	10	i.p. una vez por semana	4	40

- 10 Los resultados de prevención de metástasis/tumores secundarios (en el pulmón) se enumeran en la siguiente tabla y se muestran en la Figura 9B

Tabla 2: Cuantificación de ADN de ALU humana en los pulmones de ratones que portaban originalmente tumores KPL4 primarios, después del tratamiento con diferentes anticuerpos

	Vehículo		Xolair		Ang2i_LC06		Ang2i_LC07		Ang2i_LC08	
	101	0,0098	201	0,0157			401	0,0273	501	0,0069
	102	0,0090	202	0,0516	302	0,0076	402	0,0060	502	0,0261
	103	0,0119	203	0,0108	303	0,0413	403	0,0046	503	0,0067
	104	0,0405	204	0,0148	304	0,0042	404	0,0164	504	0,0044
			205	0,0020	305	0,0041	405	0,0040	505	0,0039
	106	0,0381	206	0,0340	306	0,0093	406	0,0044	506	0,0051
	107	0,0281	207	0,0141	307	0,0038	407	0,0060	507	0,0037
			208	0,0422	308	0,0044	408	0,0174	508	0,0037
	109	0,0121	209	0,0227	309	0,0036	409	0,0314	509	0,0051
	110	0,0143	210	0,0383	310	0,0094	410	0,0083	540	0,0200
	mediana	0,0132		0,0192		0,0044		0,0072		0,0051
	media	0,0205		0,0246		0,0098		0,0126		0,0086

- 15 Los resultados muestran una prevención muy eficaz de tumores secundarios/metástasis por ANG2i-LC06, ANG2i-LC07, ANG2k-LC08.

Ejemplo 9: efectos en el tratamiento de retinopatía

- 20 Métodos

25 Se crían de forma cruzada cachorros C57/B16 con madres lactantes CD1 y se exponen a oxígeno al 75 % de P7 a P12 (controlador de oxígeno de cámara PRO-OX 110, Biospherix Ltd, Redfield, NY) que induce la eliminación de vasos y cese de capilares en el centro de la retina. Los cachorros y las madres lactantes se colocan en aire normal lo que conduce a hipoxia relativa y a la inducción de neovascularización. En P13, se anestesió a los cachorros usando isoflurano (inducción 5 %, mantenimiento 3 % combinado con oxígeno 1,5 %) y se expuso el ojo y se realizaron inyecciones de 1 µl intraocular usando una jeringa Nanofil equipada con una aguja de calibre 35 (WPI, Sarasota, FL) en el ojo izquierdo. En P 17, se diseccionaron ambos ojos, se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 4 h a 4 °C y se disecaron las retinas. Las retinas se permeabilizaron en PBS que contenía Triton X-100 0,5 % y albúmina de suero bovino 1 %, se tiñeron con isolectina biotinilada B4 20 µg/ml (Sigma Aldrich, Gillingham,

- 30

Reino Unido) en PBS pH 6,8, Triton X-100 1 %, CaCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 0,1 mM, seguido de ALEXA 488-estreptavidina 20 µg/ml (Molecular Probes, Eugene, OR) y se montaron en plano en Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se capturaron imágenes de las retinas usando un microscopio de epifluorescencia Nikon a aumento 4x. Se realizó cuantificación de áreas neovasculares e isquémicas de una manera ciega usando Photoshop CS3 junto con Image J (NIH) y se expresó como porcentaje de área retiniana total (=normal+isquémica+neovascular).

Resultados

La Figura 10A muestra retinas montadas en plano representativas con la vasculatura retiniana visualizada por tinción con isolectina. Las áreas isquémicas centrales inducen la neovascularización y el nuevo crecimiento de los vasos retinianos por regulación positiva de inductores angiogénicos. El frente neovascular es hiperproliferativo lo que conduce a vasos intrincados en un patrón de vasos irregular. Las áreas más externas contienen los vasos no afectados normales. La cuantificación de montajes planos retinianos mostró que la inhibición de VEGF con Avastin redujo la neovascularización retiniana (véase figura 10B, no inyectado 36,7 ± 1,8 % frente a inyectado 22,4 ± 3,0 %) como se esperaba. La inhibición de Ang2 usando los anticuerpos LC06 o LC08 también condujo a una reducción en la neovascularización (31,5 ± 1,1 % a 18,8 ± 1,3 % y 34,0 ± 3,1% a 25,4 ± 3,4%). La inyección de control de IgG humana no tuvo ningún efecto en la neovascularización (véase figura 10B, 38,3 ± 1,1 % a 38,3 ± 0,8 %).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Anticuerpos contra angiopoyetina 2 humana

<130> 25688

<150> EP 08021835.7

<151> 16-12-2008

<160> 63

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 1

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> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 2

ES 2 534 635 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

5 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
 <400> 9

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

15 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2i_LC07
 <400> 10

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

25 Gly
 <210> 11

ES 2 534 635 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> 16
- <211> 110
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> dominio variable de cadena ligera, <ANG-2>Ang2i_LC07
- <400> 16

ES 2 534 635 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

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

5 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08
 <400> 17

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

15 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08
 <400> 18

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

25 Gly
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

ES 2 534 635 T3

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada, <ANG-2>Ang2k_LC08
 <400> 19
 5
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5

 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10

 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera, <ANG-2>Ang2k_LC08
 15
 <400> 20

 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
 1 5 10
 20
 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera, <ANG-2>Ang2k_LC08
 <400> 21

 Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5
 30

 <210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35

 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera, <ANG-2>Ang2k_LC08
 40
 <400> 22

 Ser Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn
 1 5 10
 45
 <210> 23
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC08
 <400> 23

ES 2 534 635 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

5 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
 <400> 25

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
 1 5

15 <210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09
 <400> 26

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

25 Val Lys Gly

30 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 534 635 T3

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09

5 <400> 27

Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

10 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 28

Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro
 1 5

20 <210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 29

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

30 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_LC09

40 <400> 30

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

45 <210> 31
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 31

ES 2 534 635 T3

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

5 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 33

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

15 <210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 34

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

25 Gly

<210> 35

ES 2 534 635 T3

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> CDR1 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 35

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> CDR3 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10

20 <400> 36

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

25

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> CDR2 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 37

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

35

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> CDR1 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 38

45

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

50

<210> 39
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 39

ES 2 534 635 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> 40
- <211> 105
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> dominio variable de cadena ligera, <ANG-2> Ang2i_LC10
- <400> 40

ES 2 534 635 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

5 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
 <400> 41

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

15 <210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11
 <400> 42

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

25 Gly

30 <210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 534 635 T3

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11

5 <400> 43

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 44
<211> 12
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11

15 <400> 44

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

20 <210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> CDR2 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

30 <210> 46
<211> 11
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2k_LC11

40 <400> 46

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

45 <210> 47
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 47

ES 2 534 635 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 Pro Gly Val Phe Gly
 85 90 95

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

5 <210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
 <400> 49

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
 1 5

15 <210> 50
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
 <400> 50

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

25 Val Lys Gly

30 <210> 51
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 534 635 T3

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

5 <400> 51

Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> CDR3 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

15 <400> 52

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

20 <210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 53

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

30

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> CDR1 de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

40 <400> 54

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

45 <210> 55
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> dominio variable de cadena pesada, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 55

ES 2 534 635 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> 56
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> dominio variable de cadena ligera, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

10

<400> 56

ES 2 534 635 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> 57
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 57

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

10

ES 2 534 635 T3

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> 58
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 58

5

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

10

ES 2 534 635 T3

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				
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> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

5

10

ES 2 534 635 T3

<210> 61
 <211> 1124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 61

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

ES 2 534 635 T3

	195		200		205														
Arg	Arg	Cys	Glu	Ala	Gln	Lys	Trp	Gly	Pro	Glu	Cys	Asn	His	Leu	Cys				
	210					215					220								
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						

ES 2 534 635 T3

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
450 455 460

Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys
465 470 475 480

Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln
485 490 495

Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu
500 505 510

Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly
515 520 525

His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro
530 535 540

Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn
545 550 555 560

Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val
565 570 575

Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys
580 585 590

Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg
595 600 605

Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu
610 615 620

Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro
625 630 635 640

Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val
645 650 655

Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile
660 665 670

ES 2 534 635 T3

Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys
675 680 685

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

ES 2 534 635 T3

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 G
 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

<210> 62
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 534 635 T3

<220>

<223> Angiopoyetina-2 (ANG-2) humana con líder y marcador de His

<400> 62

5

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

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

ES 2 534 635 T3

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
 405 410 415

Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys
 420 425 430

Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp

ES 2 534 635 T3

435 440 445

Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln
 450 455 460

Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser
 465 470 475 480

Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe
 485 490 495

Ser Gly His His His His His His
 500

5 <210> 63
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Angiopoyetina-1 (ANG-1) humana con líder y marcador de His

<400> 63

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His
 1 5 10 15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg
 20 25 30

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro
 35 40 45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr
 50 55 60

Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser
 65 70 75 80

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

ES 2 534 635 T3

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
 305 310 315 320

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

Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 340 345 350

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln

ES 2 534 635 T3

355		360		365											
Arg	Gln	Tyr	Met	Leu	Arg	Ile	Glu	Leu	Met	Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Arg
370						375					380				
Ala	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Asp	Arg	Phe	His	Ile	Gly	Asn	Glu	Lys	Gln	Asn
385					390					395					400
Tyr	Arg	Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	His	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Gln	Ser
				405					410						415
Ser	Leu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Asp	Asn
			420					425					430		
Asp	Asn	Cys	Met	Cys	Lys	Cys	Ala	Leu	Met	Leu	Thr	Gly	Gly	Trp	Trp
		435					440					445			
Phe	Asp	Ala	Cys	Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Met	Phe	Tyr	Thr	Ala
450						455					460				
Gly	Gln	Asn	His	Gly	Lys	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Trp	His	Tyr	Phe	Lys
465					470					475					480
Gly	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Thr	Met	Met	Ile	Arg	Pro	Leu
				485						490					495
Asp	Phe	Ser	Gly	His											
			500							505					

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente con angiopoyetina-2 (ANG-2) humana, caracterizado por que
- a) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEC ID N°: 1, una región CDR2 de SEC ID N°: 2 y una región CDR1 de SEC ID N°: 3 y
- b) el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEC ID N°: 4, una región CDR2 de SEC ID N°: 5 y una región CDR1 de SEC ID N°: 6.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que comprende
- a) el dominio variable de cadena pesada de SEC ID N°: 7; y
- b) el dominio variable de cadena ligera de SEC ID N°: 8.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, caracterizado por que el anticuerpo no se une con Angiopoyetina 1 (ANG-1) humana.
- 20 4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho anticuerpo es de la subclase IgG4 humana o es de la subclase IgG1 humana.
5. Una composición farmacéutica caracterizada por que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en terapia.
7. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método para la prevención de la metástasis.
- 30 8. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método de tratamiento del cáncer.
9. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método de tratamiento de enfermedades vasculares.
- 35 10. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método de tratamiento de la retinopatía.
- 40 11. Un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo que se une específicamente con angiopoyetina-2 (ANG-2) humana, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera de acuerdo con la reivindicación 1.
- 45 12. Un vector de expresión caracterizado por que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 para la expresión de un anticuerpo que se une específicamente con angiopoyetina-2 (ANG-2) humana en una célula hospedadora procariota o eucariota.
13. Célula hospedadora procariota o eucariota que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 12.

Fig. 1A

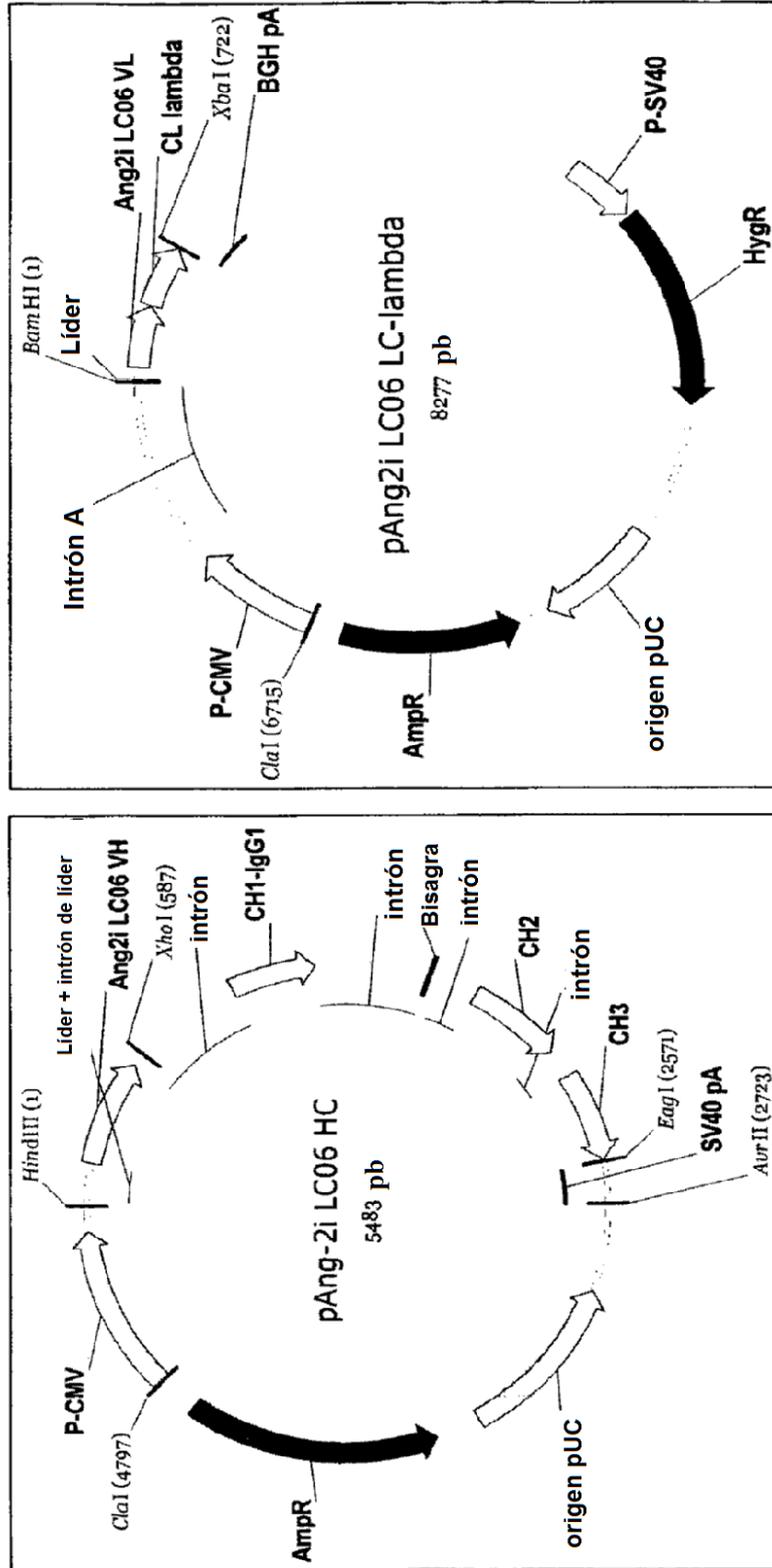


Fig. 1B

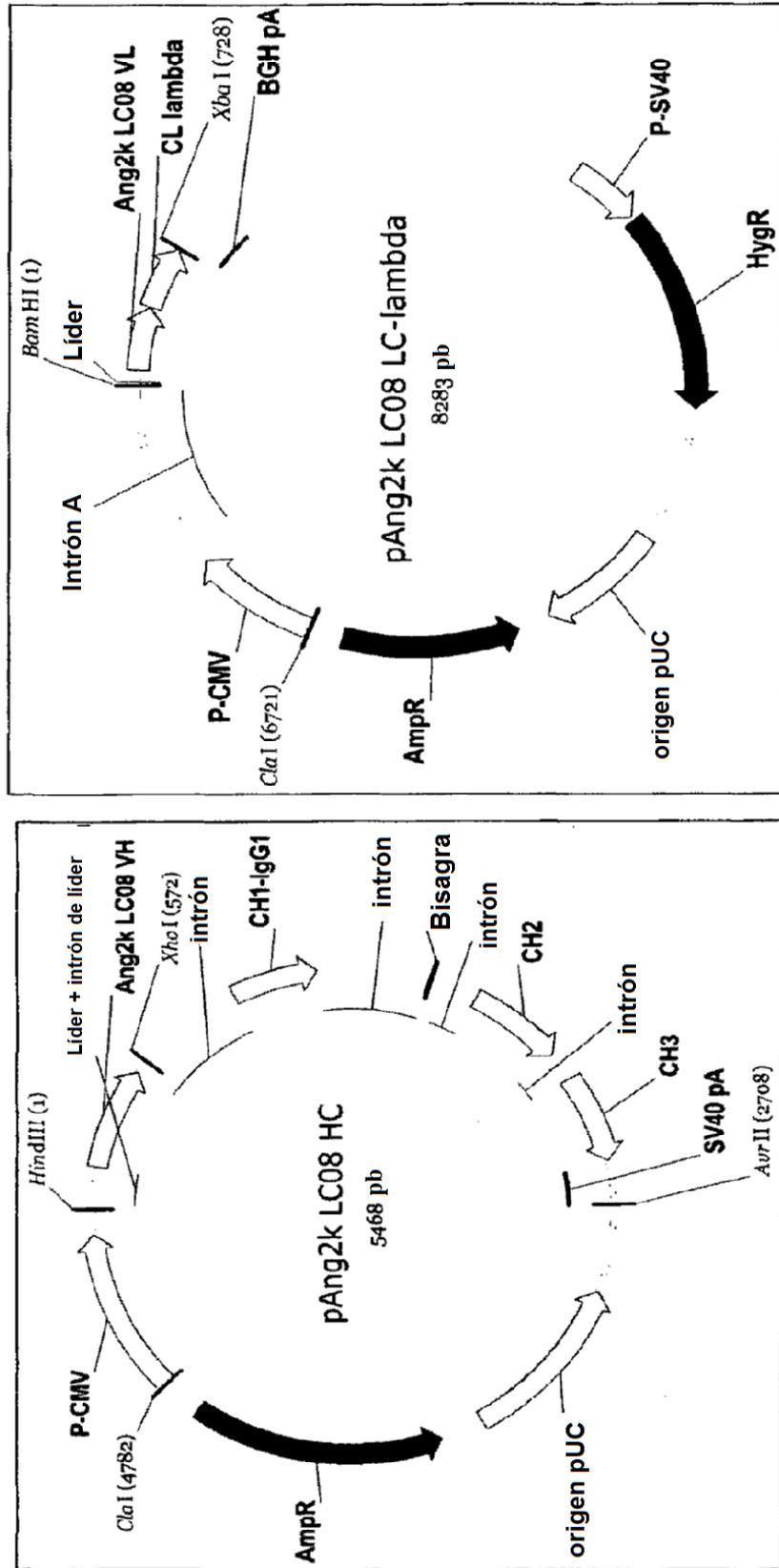


Fig. 2

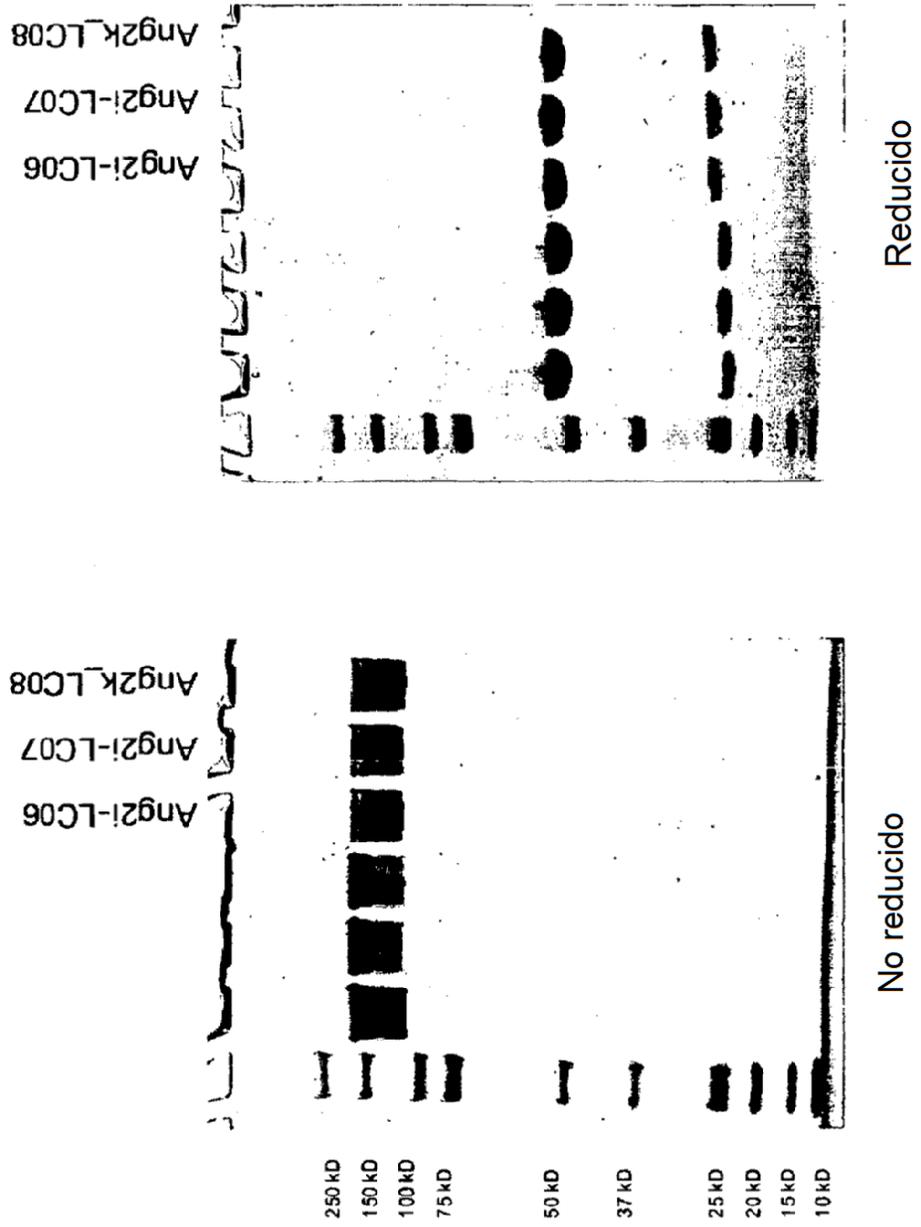


Fig. 3

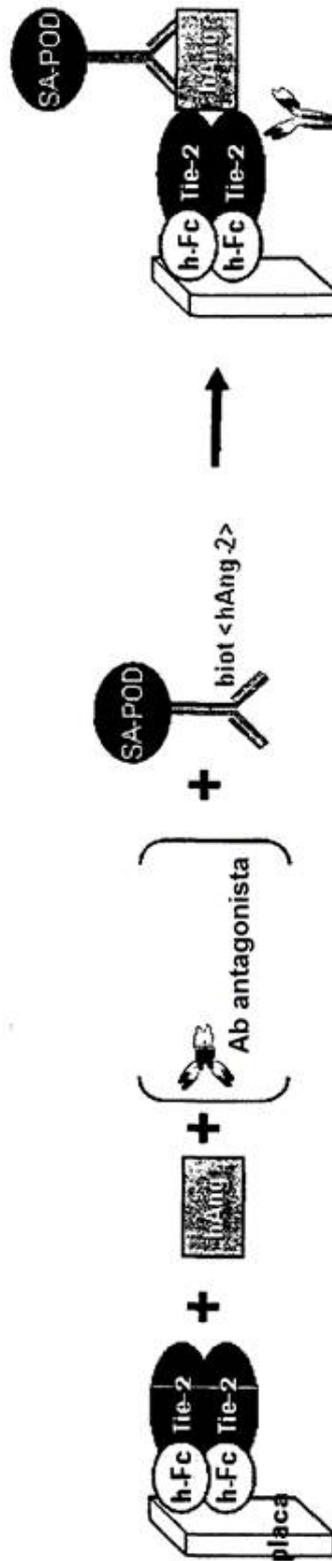


Fig. 4

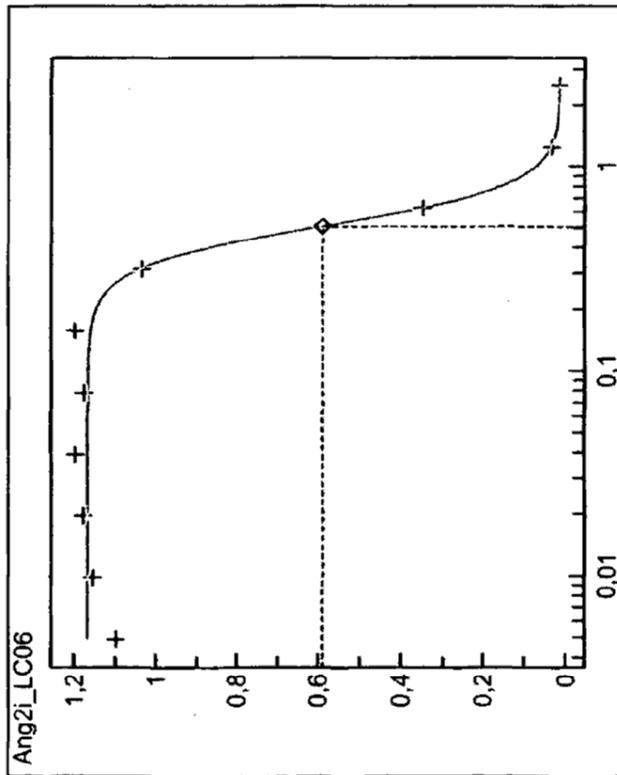
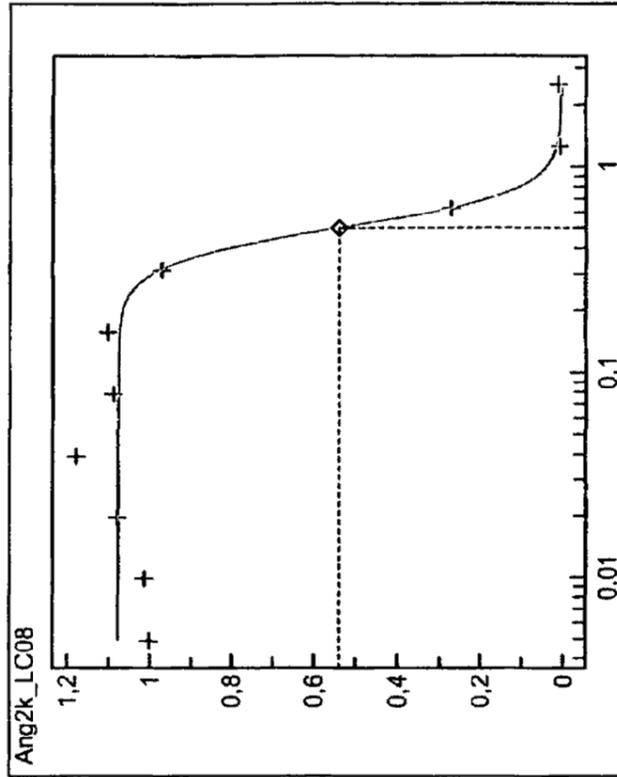


Fig. 5

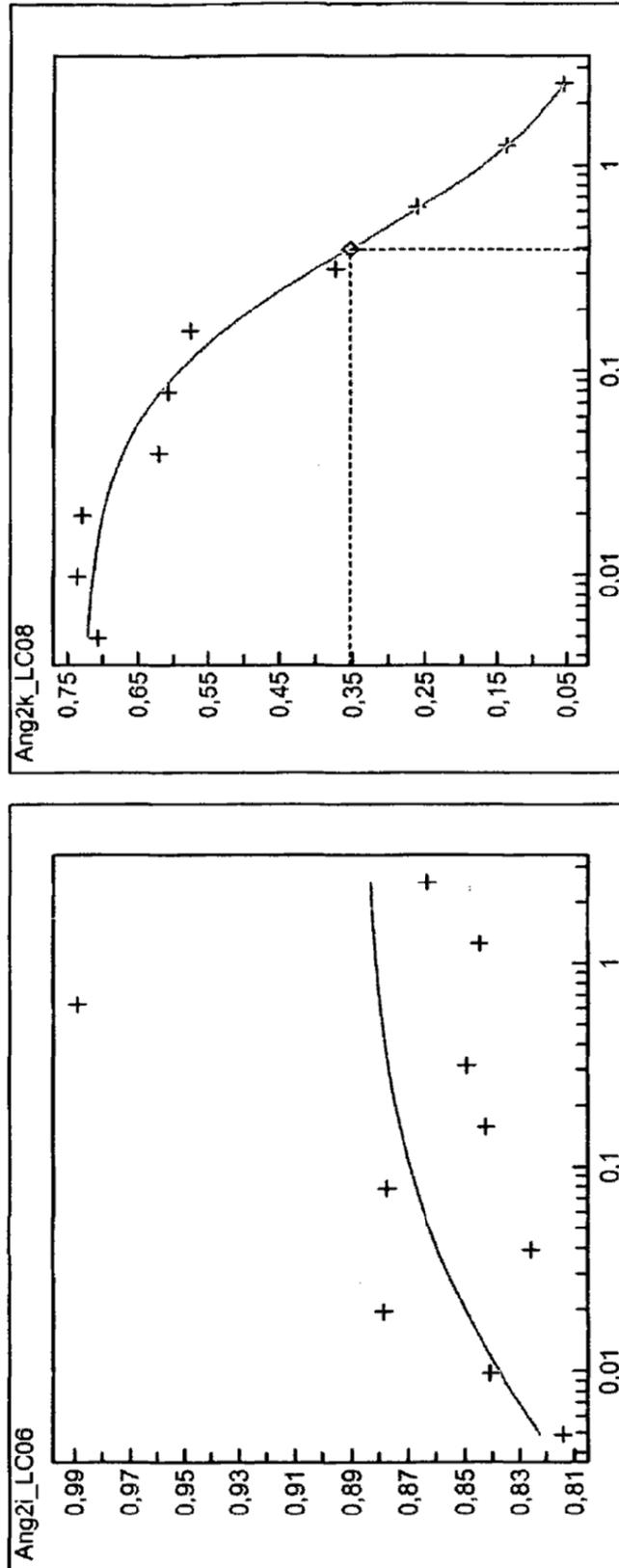


Fig. 6

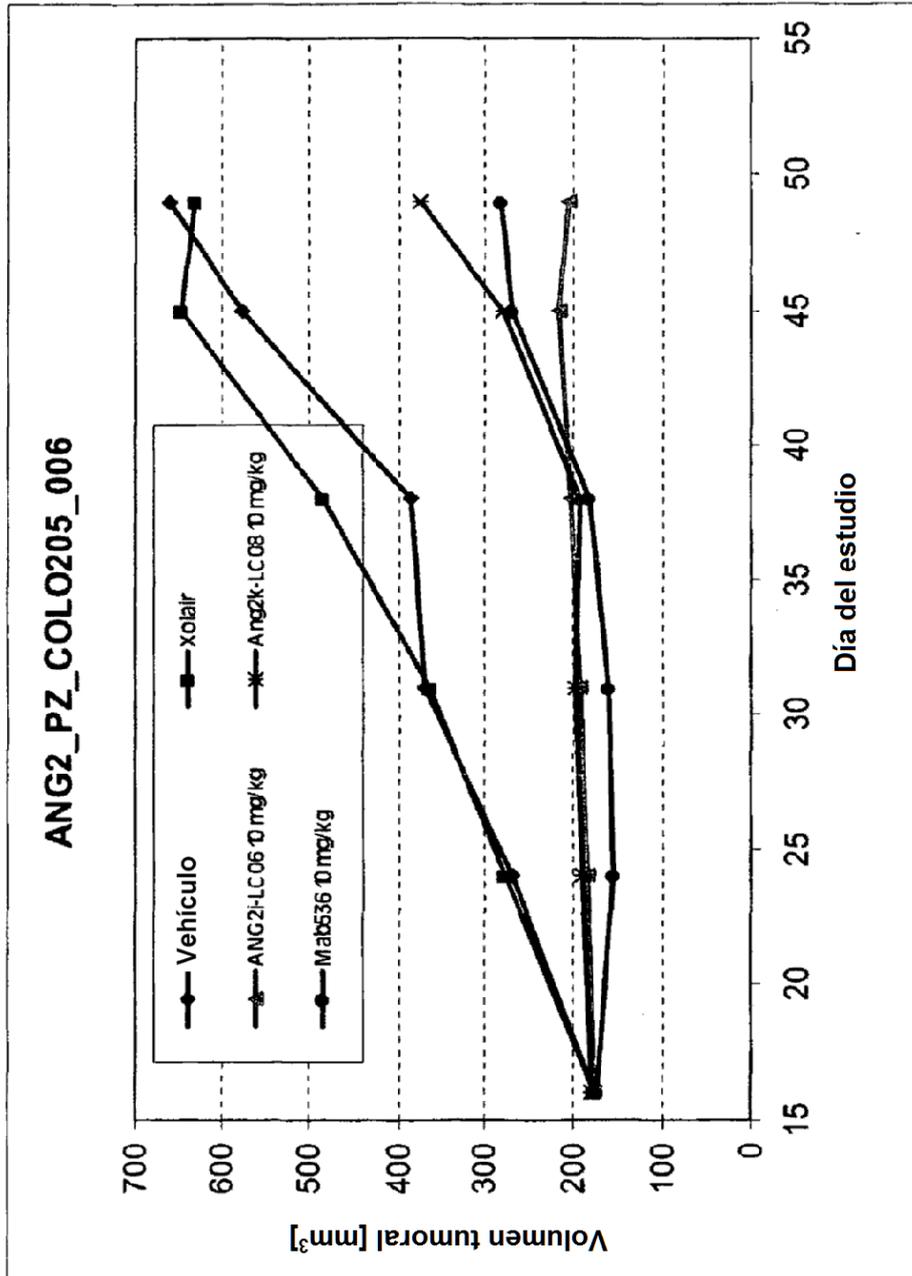


Fig. 7

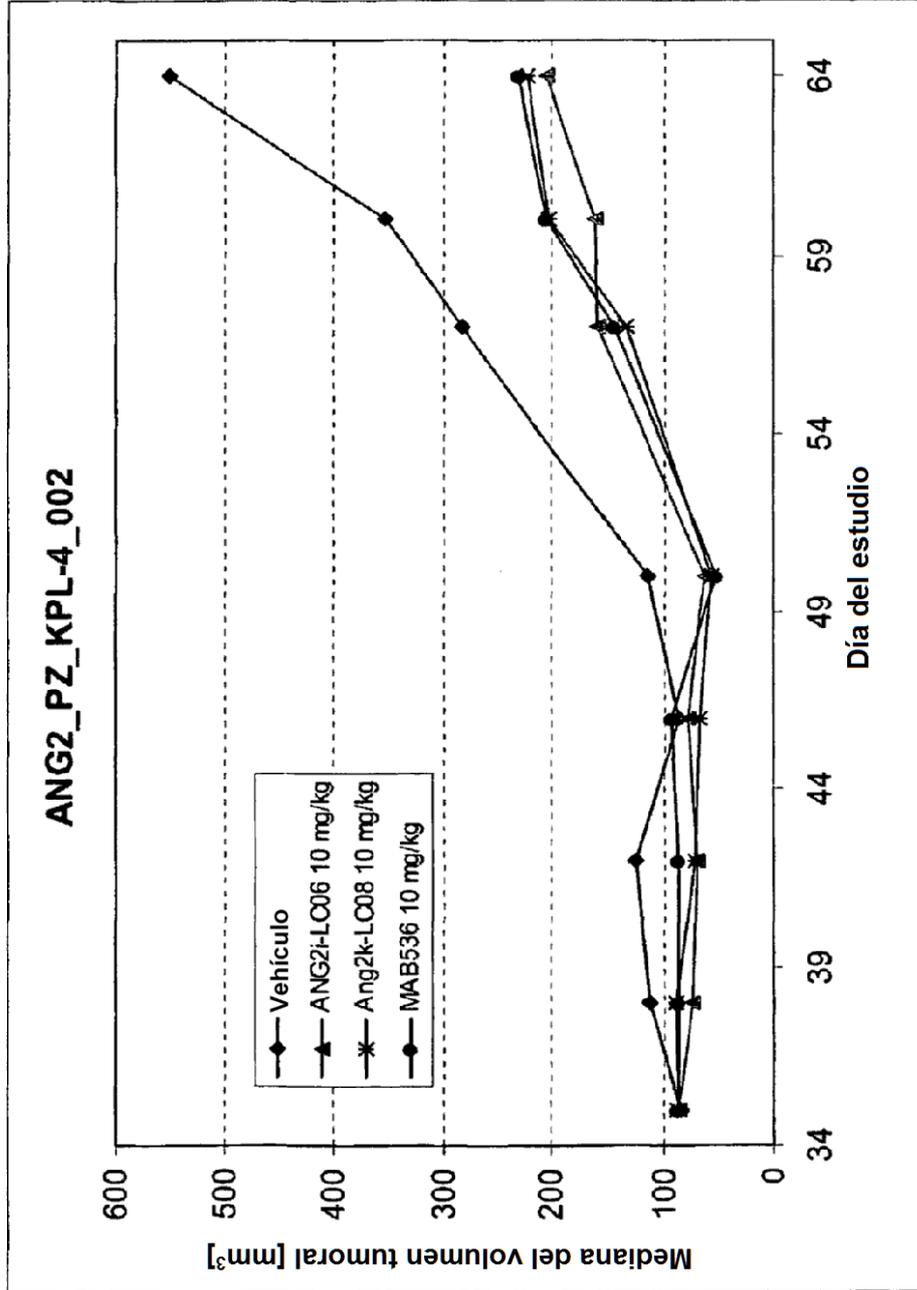


Fig. 8

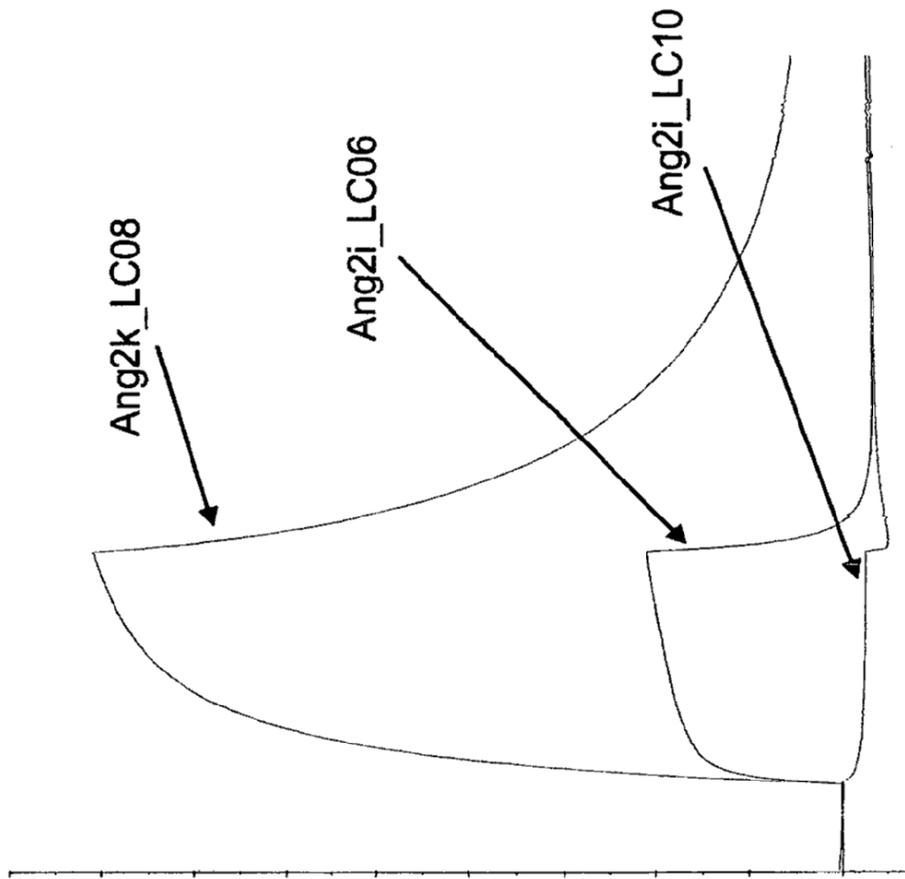


Fig. 9A

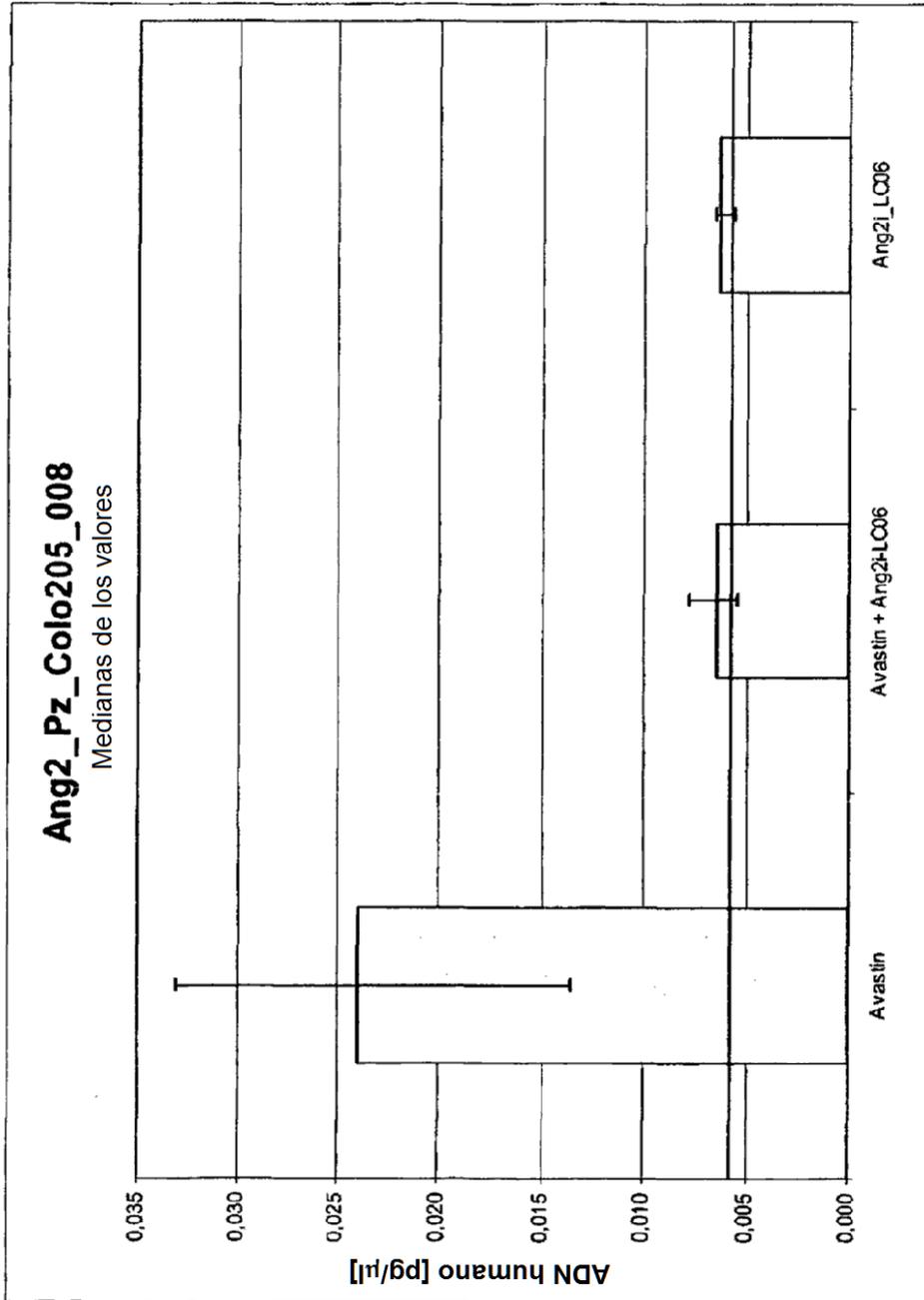


Fig. 9B

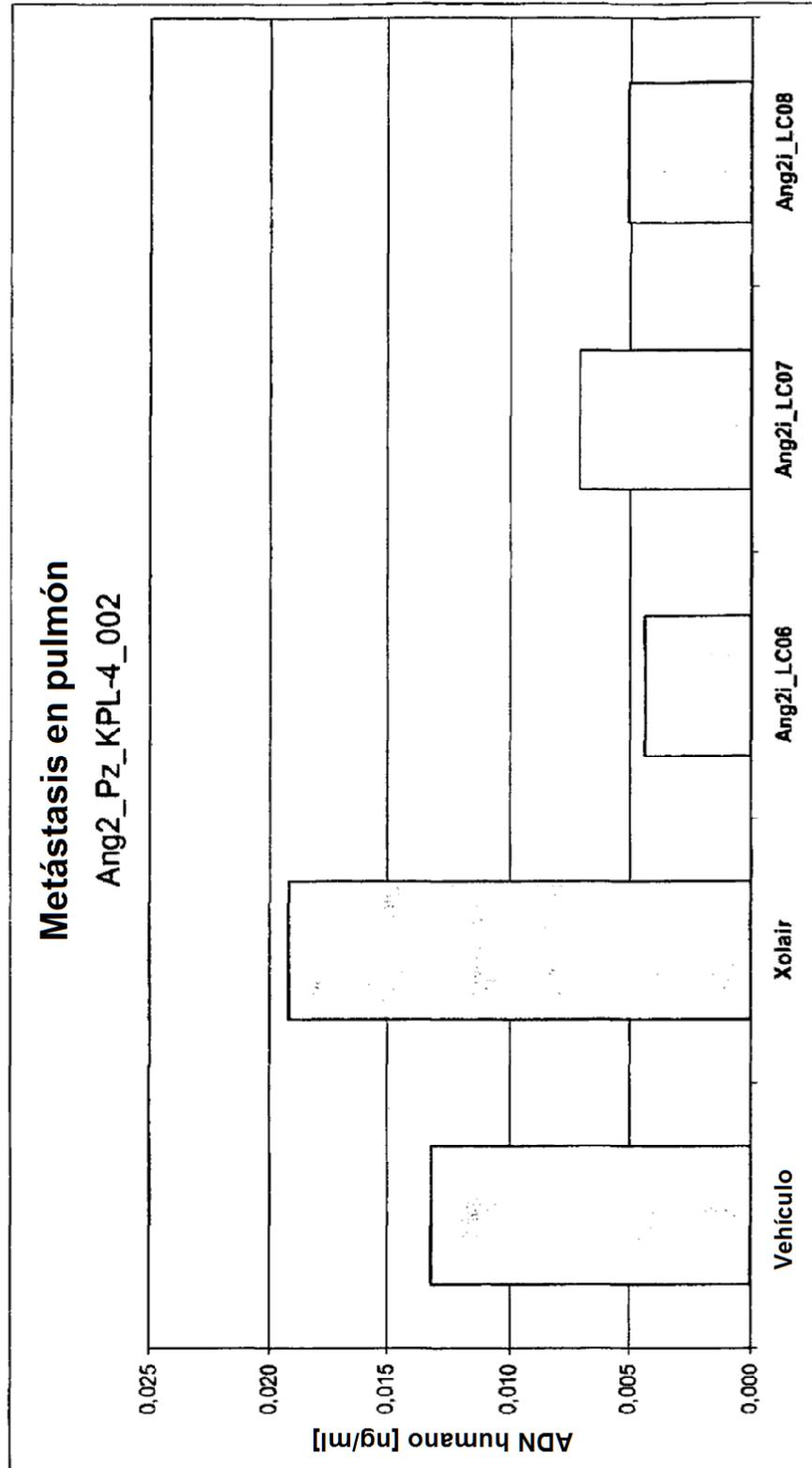


Fig. 10A

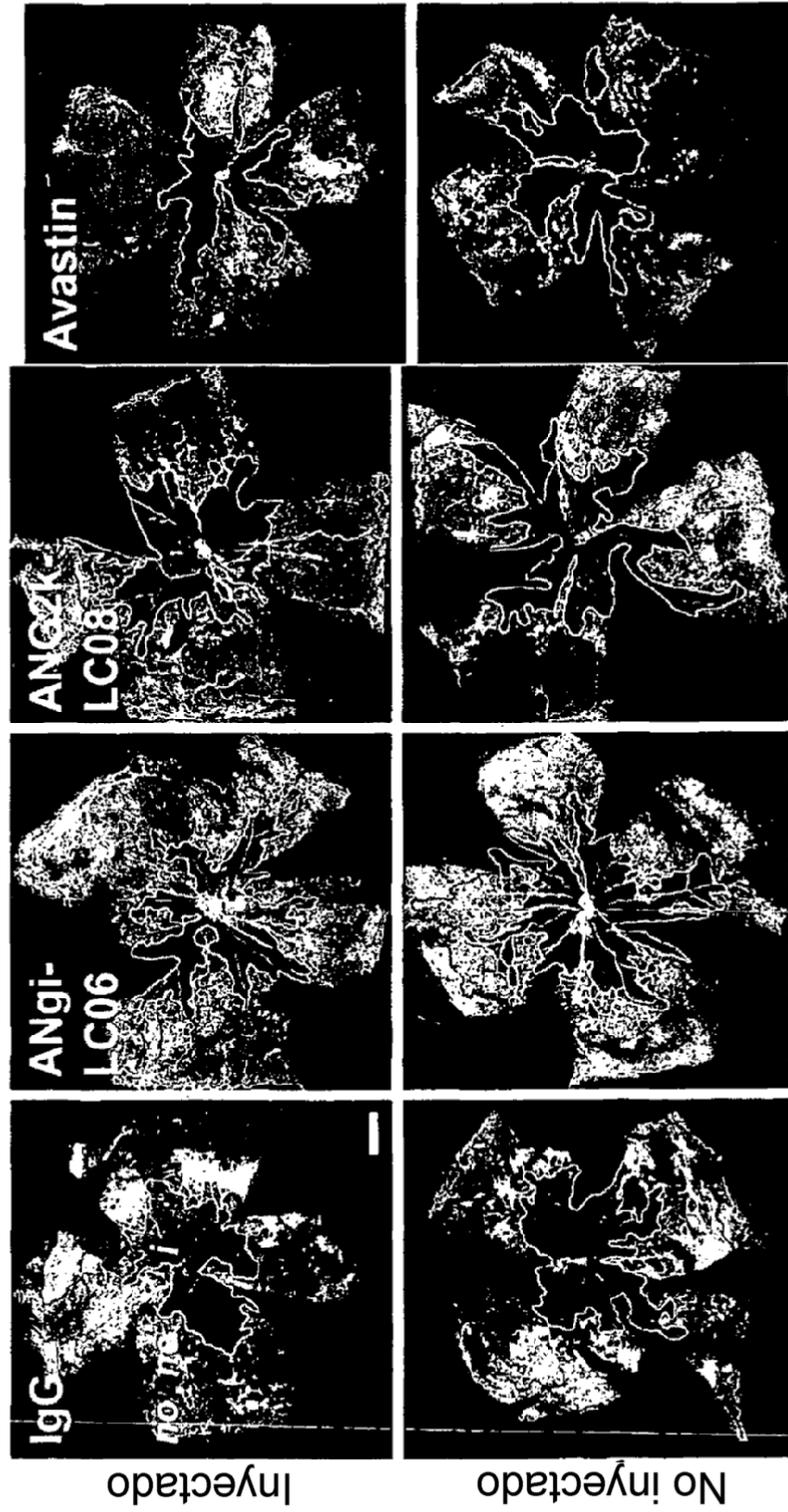


Fig. 10B

