

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 381**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2009 E 13185473 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2679599**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos a angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2 y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**20.02.2008 US 66632 P**

**16.06.2008 US 61943 P**

**19.12.2008 US 139361 P**

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

**22.03.2018**

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)**

**Law Department One Amgen Center Drive  
Thousand Oaks, CA 91320, US**

72 Inventor/es:

**BOONE, THOMAS C.;**  
**OLINER, JONATHAN D. y**  
**LEE, EUNKYUNG**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 660 381 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 dirigidos a angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2 y uso de los mismos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a agentes de unión específica que reconocen y se unen a angiopoyetina-1 (Ang-1) y/o angiopoyetina-2 (Ang-2). Más específicamente, la invención se refiere a la producción, al uso diagnóstico y al uso terapéutico de anticuerpos monoclonales y policlonales, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a Ang-1 y/o Ang-2. Aspectos de la invención también se refieren a hibridomas u otras líneas celulares que expresan tales anticuerpos. Los anticuerpos descritos son útiles para el diagnóstico y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad y sobreproducción de Ang-1 o Ang-2.

**10 Antecedentes de la invención**

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

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

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

35 Los fenotipos de ratones deficientes en Tie-2 y Ang-1 son similares y sugieren que la fosforilación de Tie-2 estimulada por Ang-1 media en la remodelación y estabilización de vasos en desarrollo *in utero* a través del mantenimiento de la adhesión de células endoteliales-células de soporte (Dumont, D. J., *et al.*, *Genes & Development*, 8:1897-1909 [1994]; Sato, T. N., *et al.*, *Nature*, 376:70-14 [1995]; Suri, C., *et al.*, [1996], citado anteriormente). Se cree que el papel de Ang-1 en la estabilización de los vasos está conservado en el adulto, donde se expresa ampliamente y de manera constitutiva (Hanahan, D., *Science*, 277:48-50 [1997]; Zagzag, D., *et al.*, *Experimental Neurology*, 159:391-400 [1999]). En cambio, la expresión de Ang-2 se limita principalmente a sitios de remodelación vascular, donde se cree que bloquea la función de Ang-1, induciendo de ese modo un estado de plasticidad vascular propicio para la angiogénesis (Hanahan, D., [1997], citado anteriormente; Holash, J., *et al.*, *Science*, 284:1994-1998 [1999]; Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], citado anteriormente).

40 Numerosos estudios publicados han demostrado supuestamente la expresión de Ang-2 selectiva de vasos en estados patológicos asociados con angiogénesis. Estos estados patológicos incluyen, por ejemplo, psoriasis, degeneración macular y cáncer (Bunone, G., *et al.*, *American Journal of Pathology*, 155:1967-1976 [1999]; Etoh, T., *et al.*, *Cancer Research*, 61:2145-2153 [2001]; Hangai, M., *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42:1617-1625 [2001]; Holash, J., *et al.*, [1999] citado anteriormente; Kuroda, K., *et al.*, *Journal of Investigative Dermatology*, 116:713-720 [2001]; Otani, A., *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40:1912-1920 [1999]; Stratmann, A., *et al.*, *American Journal of Pathology*, 153:1459-1466 [1998]; Tanaka, S., *et al.*, *J Clin Invest*, 103:34-345 [1999]; Yoshida, Y., *et al.*, *International Journal of Oncology*, 15: 1221-1225 [1999]; Yuan, K., *et al.*, *Journal of Periodontal Research*, 35:165-171 [2000]; Zagzag, D., *et al.*, [1999] citado anteriormente). La mayoría de  
55

5 estos estudios se han centrado en el cáncer, en el que muchos tipos de tumores parecen presentar expresión de Ang-2 vascular. En contraposición con su expresión en angiogénesis patológica, la expresión de Ang-2 en tejidos normales es extremadamente limitada (Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], citado anteriormente; Mezquita, J., *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 260:492-498 [1999]). En el adulto normal, los tres sitios principales de angiogénesis son el ovario, la placenta y el útero; estos son los tejidos primarios en tejidos normales (es decir, no cancerosos) en los que se ha detectado ARNm de Ang-2.

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

15 En los últimos años, diversas publicaciones han sugerido Ang-1, Ang-2 y Tie-2 como una posible diana para terapia anticancerígena. Por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.166.185, 5.650.490 y 5.814.464 dan a conocer cada una el concepto de anticuerpos anti-ligando de Tie-2 y cuerpos de receptor. La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0124129A1 describe determinados anticuerpos anti-Ang 2 y su uso en el tratamiento de cáncer. Lin *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95:8829-8834 [1998]) inyectaron un adenovirus que expresaba Tie2 soluble en ratones; el Tie-2 soluble disminuyó supuestamente el número y tamaño de los tumores desarrollados por los ratones. En un estudio relacionado, Lin *et al.* (J. Clin. Invest., 100:2072-2078 [1997]) inyectaron una forma soluble de Tie-2 en ratas; este compuesto redujo supuestamente el tamaño tumoral en las ratas. Siemeister *et al.* (Cancer Res., 59:3185-3189 [1999]) generaron líneas celulares de melanoma humano que expresaban el dominio extracelular Tie-2, inyectaron estas líneas celulares en ratones desnudos y concluyeron que Tie-2 soluble daba como resultado supuestamente una "inhibición significativa" del crecimiento tumoral y la angiogénesis tumoral.

El documento WO/2006/045049 da a conocer varios anticuerpos anti-Ang2 neutralizantes.

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

### Sumario de la invención

35 Aunque muchas pruebas apuntan a la utilidad de la inhibición de los niveles de Ang2 en el tratamiento de la angiogénesis no deseada (o cualquier subconjunto de estados que implican la generación no deseada de vasos sanguíneos, como arteriogénesis), el presente estado de la técnica no aclara si la inhibición simultánea de Ang 1 sería beneficiosa en tales terapias y, si es así, qué grado de inhibición de Ang1, además de inhibición de Ang2, podría demostrar que proporciona al menos un efecto terapéutico aditivo. Por consiguiente, la presente invención aborda una necesidad no reconocida de identificar nuevos agentes que reconozcan y se unan específicamente a los ligandos tanto Ang-1 como Ang-2. Los agentes de unión, tales como los anticuerpos de la presente invención tienen los niveles de actividad deseados en la inhibición de Ang2 así como Ang1 que los hacen particularmente útiles en una variedad de entornos tales como exámenes de diagnóstico, bioensayos e intervención terapéutica en enfermedades que están asociadas con actividad de Ang-1 y/o Ang-2, tales como cáncer, inflamación y otras enfermedades relacionadas con angiogénesis no deseada.

Los anticuerpos de la invención se definen en la reivindicación 1.

45 Las diversas realizaciones de la invención se refieren a anticuerpos que se unen específicamente a Ang-1 y/o Ang-2 y en los mismos inhiben la angiogénesis fisiológica o patológica. Los mecanismos mediante los cuales se logra esto pueden incluir, pero no se limitan a, o bien inhibición de la unión de Ang-1 y/o Ang-2 al receptor Tie1 y/o Tie2, inhibición de la señalización de Tie1 y/o Tie2 inducida por Ang-1 y/o Ang-2, o bien aumento del aclaramiento de Ang1 y/o Ang-2 del cuerpo de un paciente, reduciendo en el mismo la concentración eficaz de Ang1 y/o Ang-2.

50 La divulgación se refiere a un anticuerpo completamente humano que se une específicamente a Ang-1 y/o Ang-2 e impide la unión de Ang-1 y/o Ang-2 a los receptores Tie1 y/o Tie2. Aún otra realización de la invención es un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une a Ang-1 y/o Ang-2 y también inhibe la fosforilación de Tie1 y/o Tie2 inducida por Ang-1 y/o Ang-2. El anticuerpo puede unirse a Ang-1 y/o Ang-2 con una Kd de menos de aproximadamente 100 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o 1 pM. Determinadas realizaciones de la invención son anticuerpos del tipo IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

55 Se apreciará que el agente de unión específica de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo de cadena sencilla.

La invención se refiere además a un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal según la invención, así como líneas celulares que contienen (a través de cualquier medio tal como mediante transfección, transformación, electroporación) las secuencias de ácido nucleico necesarias para expresar los presentes anticuerpos específicos descritos en el presente documento.

5 También se apreciará que la invención se refiere a conjugados tal como se describen en el presente documento. El conjugado puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de la invención conjugado con otra(s) molécula(s) proteica(s), de hidratos de carbono, lipídica(s) o de restos mixtos.

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

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

15 Se apreciará que la invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo según la invención y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable. Además, la invención se refiere a una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero. La invención también proporciona un anticuerpo que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR 1) de cadena pesada de cualquiera de: SEQ ID NO. 18; la invención se refiere además a un anticuerpo que comprende una región determinante de complementariedad 2 (CDR 2) de cadena pesada de cualquiera de: SEQ ID NO. 26; SEQ ID NO. 28; y SEQ ID NO. 29.

20 La invención también se refiere a un anticuerpo que comprende una región determinante de complementariedad 3 (CDR 3) de cadena pesada de cualquiera de: SEQ ID NO. 32; SEQ ID NO. 34; SEQ ID NO. 35; SEQ ID NO. 37; SEQ ID NO. 38; y SEQ ID NO. 39.

25 La invención también proporciona un anticuerpo que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR 1) de cadena ligera de cualquiera de: SEQ ID NO. 19; SEQ ID NO. 20; SEQ ID NO. 21; SEQ ID NO. 22; SEQ ID NO. 23; SEQ ID NO. 24; y SEQ ID NO. 25.

La invención se refiere además a un anticuerpo que comprende una región determinante de complementariedad 2 (CDR 2) de cadena ligera de cualquiera de: SEQ ID NO. 27; SEQ ID NO. 30; y SEQ ID NO. 31.

30 La invención también se refiere a un anticuerpo que comprende una región determinante de complementariedad 3 (CDR 3) de cadena ligera de cualquiera de: SEQ ID NO. 33; SEQ ID NO. 36; y SEQ ID NO. 40.

35 Otras realizaciones de la invención incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, vectores que tienen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para anticuerpos anti-Ang-1 y/o anti-Ang-2 o una célula huésped transformada con cualquiera de tales moléculas de ácido nucleico. Además, una realización de la invención es un método de producción de un anticuerpo anti-Ang-1 y/o anti-Ang-2 cultivando células huésped en condiciones en las que se expresa una molécula de ácido nucleico para producir el anticuerpo seguido por recuperar el anticuerpo. Debe entenderse que las realizaciones de la invención también incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifique para un anticuerpo de la invención incluyendo secuencias de ácido nucleico optimizadas para aumentar los rendimientos de anticuerpos cuando se transfectan dentro de células huésped para la producción de anticuerpos.

40 El anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y la cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende 3 CDR de cadena pesada (HC) y dicho dominio variable de cadena ligera comprende 3 CDR de cadena ligera (LC), en el que las secuencias de dichas CDR de HC y LC del anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste en:

- 45 (a) SEQ ID NO: 18, 26, 32 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (b) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (c) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 20, 27, 36 de la LC,  
 (d) SEQ ID NO: 18, 26, 37 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (e) SEQ ID NO: 18, 26, 38 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 50 (f) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (g) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 21, 27, 33 de la LC,

- (h) SEQ ID NO: 18, 28, 39 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (i) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 22, 27, 33 de la LC,  
 (j) SEQ ID NO: 18, 26, 32 de la HC más SEQ ID NO: 22, 27, 33 de la LC,  
 (k) SEQ ID NO: 18, 29, 39 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 5 (l) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 23, 27, 33 de la LC,  
 (m) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 20, 27,40 de la LC,  
 (n) SEQ ID NO: 18, 26, 32 de la HC más SEQ ID NO: 21, 27, 33 de la LC,  
 (o) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 24, 27, 33 de la LC,  
 (p) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 21, 27, 33 de la LC,  
 10 (q) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 23, 27, 33 de la LC,  
 (r) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 20, 30, 33 de la LC,  
 (s) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 25, 27, 33 de la LC,  
 (t) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 20, 30, 33 de la LC,  
 (u) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 20, 27, 40 de la LC, y  
 15 (v) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 20, 31, 33 de la LC;

en el que el anticuerpo se une específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

También se contemplan moléculas de ácido nucleico que codifican para cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. Otras realizaciones de esta invención resultarán fácilmente evidentes a partir de la divulgación proporcionada con la misma.

## 20 Breve descripción de las figuras

- La figura 1 representa un gráfico del tamaño tumoral (eje y) frente al tiempo (eje x) en ratones que portan tumores tratados con o bien un anticuerpo anti-Ang1/2 (H4L4, H4L11 o H6L7) de la invención o bien un pepticuerpo control altamente potente (AMG 386) o bien anticuerpo 536, en comparación con el tratamiento con anticuerpo control de isotipo. En los ejemplos se describen detalles.
- 25 La figura 2 representa la carga tumoral (% de tumor viable [sección bisecada] x peso tumoral) en ratones que portan tumor tratados con un anticuerpo anti-Ang1/2 (H4L4, H4L11 o H6L7) de la invención o un pepticuerpo control altamente potente (AMG 386) o anticuerpo 536 en comparación con el tratamiento con un anticuerpo control de isotipo. En los ejemplos se describen detalles.
- La figura 3 representa el efecto de H4L4, H4L11 y H6L7 de la invención, un pepticuerpo control altamente potente (AMG 386) y anticuerpo 536 sobre la proliferación de células endoteliales en ratones que portan tumor Colo205. En los ejemplos se describen detalles.
- 30 La figura 4 representa la relación de dosis de anticuerpo H4L4-respuesta en ratones que portan tumor Colo205. En los ejemplos se describen detalles.
- La figura 5 representa el efecto del anticuerpo H4L4 sobre la carga tumoral de Colo205 *in vivo*. En los ejemplos se describen detalles.
- 35 La figura 6 representa el efecto del anticuerpo H4L4 sobre la proliferación de células endoteliales en ratones que portan tumor Colo205. En los ejemplos se describen detalles.
- La figura 7 representa que mL4-3 administrado de manera sistémica neutraliza la fosforilación de Tie2 inducida por Ang1 en pulmones de ratón. Se trataron ratones (n = 3 por grupo) con L1-7(N) (2 mg/kg), mL4-3 (20 mg/kg) o control de Fc (20 mg/kg) diariamente durante 23 días antes de la exposición i.v. con Ang1 o BSA. Posteriormente se recogieron los pulmones de los ratones, y se determinaron los niveles de Tie2 fosforilado mediante análisis de inmunoprecipitación-inmunotransferencia tipo Western. Los datos son valores medios  $\pm$  EE. \**P* = 0,0005 frente a Ang1 más Fc, ANOVA con prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Fisher.
- 40 La figura 8 representa que la inhibición farmacológica de Ang1 durante la organogénesis temprana altera el desarrollo del corazón. A) Embriones de ratón expuestos a mL4-3 300 mg/kg (panel derecho) tenían corazones más
- 45

pequeños con menos trabéculas, más estrechas y separadas más ampliamente con respecto a corazones más grandes con trabéculas grandes, anchas encontrados en embriones de estadio coincidente expuestos a control de Fc 300 mg/kg (panel izquierdo). Se muestran imágenes representativas. B) Incidencia de anomalías cardíacas en embriones tratados con Fc y mL4-3. \* $P < 0,0001$  frente a Fc, prueba de la chi-cuadrado.

5 La figura 9 representa el efecto de la inhibición de Ang1 y Ang2 combinada sobre el crecimiento de xenoinjertos de tumor Colo205. Se les implantaron a ratones ( $n = 10$  por grupo) células Colo205, y el tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron aproximadamente  $500 \text{ mm}^3$  con control de Fc (5,2 mg/kg cada día), mL4-3 (3,2 mg/kg cada día), L1-7(N) (2,0 mg/kg cada día), L1-7(N) combinado con mL4-3 (a los mismos regímenes de dosificación usados en los grupos de un único agente) o AMG 386 (5,6 mg/kg dos veces por semana). Se muestra uno de cuatro experimentos representativos. Los datos son valores medios  $\pm$  EE. \* $P < 0,0001$  frente a L1-7(N), RMANOVA con prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Scheffe.

15 La figura 10 representa el efecto del antagonismo de Ang1 y Ang2 sobre la proliferación de células endoteliales tumorales, angiogénesis corneal y angiogénesis retiniana. A) El efecto de la inhibición de Ang1 y Ang2 sobre la captación de BrdU en células endoteliales de ratón derivadas de xenoinjerto de tumor Colo205. Se trataron ratones que portan tumor durante 3 días con Fc (5,7 mg/kg cada día), AMG 386 (6 mg/kg dosis única), L1-7(N) (2,2 mg/kg cada día), mL4-3 (3,5 mg/kg cada día) o L1-7(N) combinado con mL4-3 (a las mismas dosis y calendarios usados en los grupos de un único agente). Cada barra representa las razones medias de BrdU en células de ratón endoteliales:totales ( $n = 3$ ). Los datos son valores medios  $\pm$  EE. \*  $P < 0,05$  frente a Fc, prueba de la t de Student para datos independientes. B y C) El efecto de la inhibición de Ang1 y Ang2 sobre la angiogénesis corneal (B) inducida por VEGF y (C) inducida por bFGF. Se indujo angiogénesis implantando discos de nailon empapados en VEGF o bFGF en el estroma corneal de ratas ( $n = 8$  por grupo). Se inició el tratamiento un día antes de la implantación corneal y continuó cada 3 días con: Fc (60 mg/kg), L1-7(N) (5 mg/kg), mL4-3 (60 mg/kg) y L1-7(N) combinado con mL4-3 (a la misma dosis y calendario usados en los grupos de un único agente). Los datos son valores medios  $\pm$  EE. <sup>†</sup> $P < 0,0001$  frente a Fc+ VEGF (B); <sup>#</sup> $p < 0,002$  frente a Fc + bFGF (C), ANOVA con prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Fisher. D) La inhibición de Ang2 impide la neovascularización inducida por oxígeno en la retina del ratón. Comenzando en el día posnatal P8, se trataron crías ( $n = 5$  por grupo) diariamente por vía s.c. durante nueve días con Fc (200 mg/kg), L1-7(N) (100 mg/kg), mL4-3 (100 mg/kg) o L1-7(N) combinado con mL4-3 (a la misma dosis y calendario usados en los grupos de un único agente). Los datos son valores medios  $\pm$  EE. <sup>§</sup> $P < 0,0001$  frente a Fc, ANOVA con prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Fisher.

30 La figura 11 representa que los inhibidores de Ang1 y Ang2 suprimen de manera cooperativa la angiogénesis folicular en el ovario. Se usó HCG para inducir superovulación en ratones. Se evaluaron Fc (300 mg/kg), mL4-3 (150 mg/kg), L1-7(N) (150 mg/kg) o una combinación de mL4-3/L1-7(N) (150 mg/kg cada uno) administrados por vía s.c. ( $n = 7-10$  ratones por grupo) para determinar la capacidad para prevenir la neovascularización en folículos en ovulación. Se calculó el área de los vasos sanguíneos a partir de secciones inmunoteñidas con anticuerpo anti-CD31 de folículos individuales. Los datos son valores medios  $\pm$  EE. Se muestran dos experimentos independientes. \* $P = 0,005$  comparando la combinación de mL4-3/L1-7(N) frente a cualquier agente único solo; <sup>#</sup> $P < 0,05$  frente a Fc, ANOVA con prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett.

### Descripción detallada de la invención

40 Los encabezamientos de secciones se usan en el presente documento sólo con fines de organización, y no debe interpretarse que limitan de ningún modo el contenido descrito.

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

50 Los términos usados para describir la presente invención, a menos que se definan específicamente en el presente documento, tendrán su significado tal como se entiende y se usa en la técnica.

55 Debe indicarse que los términos H5 y H5P se usan de manera intercambiable y se refieren a la cadena pesada usada en diversas realizaciones de la invención, por ejemplo, AcM denominados H5L7, H5L6, H5L8, H5L4, H5L11, H5L1, H5L12 y H5L9.

El término "Ang-2" se refiere al polipéptido expuesto en la figura 6 de la patente estadounidense n.º 6.166.185 ("ligando 2 de Tie-2"), o fragmentos del mismo así como a polipéptidos relacionados que incluyen variantes alélicas, variantes de corte y empalme, derivados, variantes de sustitución, delección y/o inserción, péptidos y polipéptidos de

fusión y homólogos interespecie. El polipéptido Ang-2 puede incluir o no residuos terminales adicionales, por ejemplo, secuencias líder, secuencias de direccionamiento, metionina amino-terminal, residuos de metionina y lisina amino-terminales y/o secuencias de proteínas de fusión o etiquetas, dependiendo de la manera en la que se prepara.

5 El término “agente de unión específica” se refiere a una molécula, preferiblemente una molécula proteica, que se une a Ang-2 así como a Ang-1 (y variantes y derivados de la misma tal como se define en el presente documento) con una mayor afinidad que a otras angiopoyetinas. Un agente de unión específica puede ser una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un hidrato de carbono, un lípido o un compuesto de peso molecular pequeño que se une preferentemente a Ang-2 y Ang-1. El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injerto de CDR, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo catalítico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) y anticuerpos que pueden estar marcados en forma soluble o unida, así como fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, o bien solos o bien en combinación con otras secuencias de aminoácidos, proporcionadas mediante técnica conocidas. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, escisión enzimática, escisión química, síntesis peptídica o técnicas recombinantes. Los anticuerpos específicos anti-Ang-2 y Ang-1 de la presente invención pueden unirse a partes de Ang-2 y Ang-1 que modulan, por ejemplo, inhiben o promueven, la actividad biológica de Ang-2 y Ang-1 y/u otras actividades asociadas a Ang-2 y Ang-1.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los “derivados” incluyen los agentes de unión que se han modificado químicamente de alguna manera distinta de

variantes de inserción, delección o sustitución.

“Se une específicamente” se refiere a la capacidad de un agente de unión específica (tal como un anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención) para reconocer y unirse a un polipéptido diana maduro, de longitud completa o de longitud parcial (en el presente documento Ang-2 y Ang-1), o un ortólogo del mismo, de manera que su afinidad (tal como se determina mediante, por ejemplo, ensayos de ELISA de afinidad o BIAcore tal como se describe en el presente documento) o su capacidad de neutralización (tal como se determina mediante, por ejemplo, ensayos de ELISA de neutralización descritos en el presente documento, o ensayos similares) es al menos 10 veces superior, pero opcionalmente 50 veces superior, 100, 250 ó 500 veces superior, o incluso al menos 1000 veces superior a la afinidad o capacidad de neutralización del mismo para cualquier otra angiopoyetina u otro péptido o polipéptido.

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

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

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

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

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

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

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

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

10 El término “cadena pesada” cuando se usa en referencia a un anticuerpo se refiere de manera colectiva a cinco tipos distintos, denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, basándose en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada. La combinación de cadenas pesadas y ligeras da lugar a cinco clases conocidas de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases conocidas de IgG, denominadas IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>.

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

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

20 El término “maduro” cuando se usa en relación con Ang-2, anticuerpo anti-Ang-2 o con cualquier otro agente de unión específica proteico de Ang-2, se refiere a un péptido o un polipéptido que carece de una secuencia líder o señal. Cuando se expresa un agente de unión de la invención, por ejemplo, en una célula huésped procarionta, el péptido o polipéptido “maduro” también puede incluir residuos de aminoácido adicionales (pero todavía carecer de una secuencia líder) tal como una metionina amino-terminal, o uno o más residuos de metionina y lisina. Un péptido o polipéptido producido de esta manera puede utilizarse habiéndose eliminado o no estos residuos de aminoácido adicionales.

#### Agentes de unión específica y anticuerpos

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “agente de unión específica” se refiere a una molécula que tiene especificidad para reconocer y unirse a Ang-2 y Ang-1, tal como se describe en el presente documento. Los agentes de unión específica adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y derivados de los mismos, polipéptidos y moléculas pequeñas. Pueden prepararse agentes de unión específica adecuados usando métodos conocidos en la técnica. Un anticuerpo específico para polipéptido Ang-2 y Ang-1 a modo de ejemplo de la presente invención puede unirse a una determinada parte de los polipéptidos Ang-2 y Ang-1, y preferiblemente modular la actividad o función de polipéptidos Ang-2 y Ang-1.

35 Anticuerpos específicos que se unen específicamente a polipéptidos Ang-2 y Ang-1 están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser recombinantes, quiméricos, humanizados tales como con injerto de CDR, humanos, de cadena sencilla, catalíticos, multiespecíficos y/o biespecíficos, así como fragmentos de unión a antígeno, variantes, y/o derivados de los mismos.

40 Generalmente se producen anticuerpos policlonales contra polipéptidos Ang2 y Ang1 en animales (por ejemplo, conejos, hámsteres, cabras, ovejas, caballos, cerdos, ratas, jerbos, cobayas, ratones o cualquier otro mamífero adecuado, así como otras especies no de mamífero) por medio de múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de polipéptido Ang-2 y/o Ang-1 o un fragmento del mismo con o sin un adyuvante. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, completo e incompleto de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son adyuvantes para seres humanos potencialmente útiles. Puede ser útil conjugar un polipéptido antigénico con una proteína portadora que es inmunogénica en la especie que va a inmunizarse, tal como hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja. Además, se usan agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria. Tras la inmunización, se extrae sangre de los animales y se somete a ensayo el suero para determinar el título de anticuerpo anti-polipéptido Ang-2 que puede determinarse usando los ensayos descritos en el presente documento en los “Ejemplos”. Pueden utilizarse anticuerpos policlonales en los sueros a partir de los que se detectaron, o pueden purificarse de los sueros usando, por ejemplo, cromatografía de afinidad a antígeno o cromatografía de afinidad de proteína A o G.

55 Pueden producirse anticuerpos monoclonales dirigidos hacia polipéptidos Ang-2 usando, por ejemplo, pero sin limitación, el método de “hibridoma” tradicional o la técnica de “presentación en fago” más reciente. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales de la invención mediante el método de hibridoma tal como se describe en Kohler *et al.*, Nature 256:495 [1975]; la técnica de hibridoma de células B humanas [Kosbor *et al.*, Immunol Today 4:72 35 (1983); Cote *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA) 80: 2026-2030 (1983); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody

Production Techniques and Applications, págs. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987)] y la técnica de hibridoma de VEB [Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, Nueva York N.Y., págs. 77-96, (1985)]. También se proporcionan por la invención líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con polipéptidos Ang-2.

5 Cuando se emplea la técnica de hibridoma, pueden usarse líneas celulares de mieloma. Preferiblemente tales líneas celulares adecuadas para su uso en procedimientos de fusión de producción de hibridomas no producen anticuerpos, tienen alta eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que hacen que no puedan crecer en determinados medios selectivos que sólo soportan el crecimiento de las células fusionadas deseada (hibridomas). Por ejemplo, líneas celulares usadas en fusiones de ratón son Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, 10 Sp210-Ag14, PO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XXO Bul; líneas celulares usadas en fusiones de rata son R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para fusiones celulares son U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6.

También puede usarse la técnica de presentación en fago para generar anticuerpos monoclonales de cualquier especie. Preferiblemente, esta técnica se usa para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos en la que se expresa un polinucleótido que codifica para un único fragmento de anticuerpo Fab o Fv sobre la superficie de una partícula de fago. [Hoogenboom *et al.*, J Mol Biol 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J Mol Biol 222: 581 (1991); véase también la patente estadounidense n.º 5.885.793]. Cada fago puede “examinarse” usando ensayos de unión descritos en el presente documento para identificar los fragmentos de anticuerpo que tienen afinidad por Ang-2. Por tanto, estos procesos imitan la selección inmunitaria a través de la presentación de repertorios de fragmentos de anticuerpo sobre la superficie de un bacteriófago filamentosos, y la posterior selección del fago por su unión a Ang-2. Se describe un procedimiento de este tipo en la solicitud PCT n.º WO/1999/010494, presentada a nombre de Adams *et al.*, que describe el aislamiento de fragmentos de anticuerpo agonistas funcionales y de alta afinidad para receptores MPL y msk usando un enfoque de este tipo. En este enfoque, puede crearse un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos clonando genes V humanos reordenados de manera natural a partir de linfocitos de sangre periférica tal como se describió previamente [Mullinax *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA) 87: 8095-8099 (1990)].

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

40 En otra realización de la presente invención, puede “humanizarse” o “quimerizarse” un anticuerpo monoclonal que se deriva de una especie diferente de un ser humano. En la técnica se conocen bien métodos para humanizar anticuerpos no humanos. (Véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.859.205, 5.585.089 y 5.693.762). La humanización se realiza, por ejemplo, usando métodos descritos en la técnica [Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988)] 45 sustituyendo al menos una parte de una región determinante de complementariedad (CDR), por ejemplo de ratón, por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano. La invención también proporciona variantes y derivados de estos anticuerpos humanos tal como se comenta en el presente documento y se conoce bien en la técnica.

También quedan abarcados por la divulgación anticuerpos complemente humanos que se unen a polipéptidos Ang-2, así como fragmentos de unión a antígeno, variantes y/o derivados de los mismos. Tales anticuerpos pueden producirse usando la técnica de presentación en fago descrita anteriormente. Alternativamente, para generar tales anticuerpos pueden usarse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Esto puede lograrse mediante inmunización del animal con un antígeno Ang-2 o fragmentos del mismo donde los fragmentos de Ang-2 tienen una secuencia de aminoácidos que es única para Ang-2. Tales inmunógenos pueden conjugarse opcionalmente con un portador. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA), 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno, 7: 33 (1993). En un método, tales animales transgénicos se producen incapacitando los loci endógenos que codifican para las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera en los mismos, e insertando loci que codifican para proteínas de cadena pesada y ligera humanas en el genoma de los mismos. Entones se cruzan animales parcialmente modificados, que son los que tienen menos que el complemento completo de estas modificaciones, para obtener un animal que tiene todas las modificaciones en el sistema inmunitario deseadas. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos pueden

producir anticuerpos con regiones variables humanas, incluyendo secuencias de aminoácidos humanas (en vez de, por ejemplo, murinas), que son inmuno-específicos para los antígenos deseados. Véanse las solicitudes PCT n.<sup>os</sup> WO 1996/033735 y WO1994002602. Se describen métodos adicionales en la patente estadounidense n.º 5.545.807, las solicitudes PCT n.<sup>os</sup> WO/1991/010741, WO1990004036 y en los documentos EP 546073B1 y EP 546073A1. También pueden producirse anticuerpos humanos mediante la expresión de ADN recombinante en células huésped o mediante expresión en células de hibridoma tal como se describe en el presente documento.

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

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

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

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

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

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

Alternativamente, se crea un repertorio de cadenas pesadas humanas totalmente sintéticas a partir de segmentos génicos V no reordenados ensamblando cada segmento de VH humano con segmentos D de nucleótidos al alza junto con un segmento J humano [Hoogenboom *et al.*, *J Mol Biol* 227:381-388 (1992)]. Asimismo, se construye un repertorio de cadenas ligeras combinando cada segmento V humano con un segmento J [Griffiths *et al.*, *EMBO J* 13:3245-3260 (1994)]. Se unen nucleótidos que codifican para el anticuerpo completo (es decir, cadenas tanto pesada como ligera) como un fragmento Fv de cadena sencilla y se liga este polinucleótido a un nucleótido que codifica para una proteína de recubrimiento menor de fago filamentoso. Cuando se expresa esta proteína de fusión sobre la superficie del fago, se identifica un polinucleótido que codifica para un anticuerpo específico mediante selección usando un antígeno inmovilizado.

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

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

10 Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender además cualquier región constante conocida en la técnica. La región constante de cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada pueden ser, por ejemplo, regiones constantes de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu humana. En una realización, la región constante de cadena pesada o ligera es un fragmento, derivado, variante o muteína de una región constante que se produce de manera natural.

15 En una realización, los anticuerpos de la presente invención comprenden una IgG.

20 Se conocen técnicas para derivar un anticuerpo de una subclase o isotipo diferente a partir de un anticuerpo de interés, es decir, cambio de subclase. Por tanto, pueden derivarse anticuerpos de IgG a partir de un anticuerpo de IgM, por ejemplo, y viceversa. Tales técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que presentan las propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo original), pero también presentan propiedades biológicas asociadas con un isotipo o subclase de anticuerpo diferente de aquel del anticuerpo original. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante. Puede emplearse ADN clonado que codifica para polipéptidos como anticuerpos particulares en tales procedimientos, por ejemplo, ADN que codifica para el dominio constante de un anticuerpo del isotipo deseado. Véase también Lantto *et al.*, 2002, *Methods Mol. Biol.* 178:303-16.

25 Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender el dominio constante de cadena pesada de IgG1 o un fragmento del dominio de cadena pesada de IgG1. Los anticuerpos de la invención pueden comprender además los dominios kappa o lambda de cadena ligera constante o un fragmento de estos. A continuación en el presente documento se proporcionan regiones constantes de cadena ligera y polinucleótidos que codifican para los mismos. En otra realización, los anticuerpos de la invención comprenden además un dominio constante de cadena pesada, o un fragmento del mismo, tal como la región constante de cadena pesada de IgG2 también mostrada a continuación en el presente documento.

30 El ácido nucleico (ADN) que codifica para los dominios de cadena ligera constante y pesada constante, y las secuencias de aminoácidos de dominios de cadena ligera y pesada se proporcionan a continuación en el presente documento. Pueden fusionarse dominios variables lambda a dominios constantes lambda y pueden fusionarse dominios variables kappa a dominios constantes kappa.

35 ADN de dominio constante pesado de IgG2 (SEQ ID NO: 41):

```

gctagcaccaagggcccctcggctctccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggctgcc
tggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacacctcccagctg
tcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcaccagacctacacctgcaa
cgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgtgtgtcagtgcccaccgtgccagcagc
cacctgtggcaggaccgtcagctctctctccccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggacccctgaggtcacgtg
cgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag
acaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacgg
caaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaacaaagggcagccc
cgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcctcaag
gcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctccatgct
ggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc
cgtgatgcatgaggctctgcacaacctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

```

Proteína de dominio constante pesado de IgG2 (SEQ ID NO: 42):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECP  
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK  
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ADN de dominio constante ligero kappa Light (SEQ ID NO: 43):

cgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctga  
ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacag  
agcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtct  
acgcctgcgaagtcacccatcaggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

5

Proteína de dominio constante ligero kappa (SEQ ID NO: 44):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ADN de dominio constante ligero lambda (SEQ ID NO: 45):

ggccaaccgaaagcggcgcctcggtcactctgttcccgcctctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgt  
ctcataagtgacttctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagacca  
ccacacctccaacaagcaacaacaagtagcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacag  
aagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagaccgtggagaagacagtgcccctacagaatgttcatag

10

Proteína de dominio constante ligero lambda (SEQ ID NO: 46):

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET  
TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

15

Los agentes de unión específica de la presente divulgación, tales como los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo de la invención incluyen los que comprenden, por ejemplo, las combinaciones de dominios variables H6L7, H5L7, H4L13, H11L7, H4L7, H10L7, H5L6, H2L7, H5L8, H6L8, H3L7, H5L4, H4L12, H6L6, H4L2, H4L6, H4L4, H5L11, H5L1, H4L11, H5L12, H5L9 que tienen un isotipo deseado (por ejemplo, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE e IgD) así como fragmentos Fab o F(ab)<sub>2</sub> de los mismos. Además, si se desea una IgG4, también puede ser deseable introducir una mutación puntual en la región bisagra tal como se describe en Bloom *et al.*, 1997, Protein Science 6:407 para aliviar una tendencia a formar enlaces disulfuro dentro de cadenas H que pueden conducir a heterogeneidad en los anticuerpos de IgG4.

20

Información de secuencia útil adicional

Las siguientes secuencias de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se usan en combinación con las secuencias de cadenas pesadas variables de los anticuerpos de la presente invención para preparar un isotipo deseado específico

de dicho anticuerpo:

IgG1 humana

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP  
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

IgG2 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKTVKCCVECP  
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK  
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

IgG3 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHT  
CPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPPELLGGP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQ  
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

IgG4 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCSP  
APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQFNSTYRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLGK

10 Secuencias HC de los anticuerpos de la presente invención como IgG2

Las siguientes secuencias representan las secuencias de cadenas pesadas de los anticuerpos de la presente invención como isotipo IgG2. Las secuencias de cadenas ligeras siguen siendo las mismas que se proporcionan en los ejemplos. Las partes de secuencias subrayadas representan las secuencias de IgG2:

H2

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIEY  
ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDILTGYGYWGQGLVT  
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
FPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP  
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHODWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK  
TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGOPENNYKT  
TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H3

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIQY  
ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDILTGYGYWGQGLVT  
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
FPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP  
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHODWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK  
TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGOPENNYKT  
TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 H6

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYY  
ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDIYTYGYGYWGQGLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFFAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC  
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHODWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS  
KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGOPENNYK  
TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H10

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYY  
ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDILTGYGLWGQGLVT  
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF  
RVVSVLTVVHODWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK  
NQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQO  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H11

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYY  
ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDILTGYGMWGQGLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFFAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC  
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHODWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS  
KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGOPENNYK  
TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

H4

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYY  
ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDLLTGYGYWGQGLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH  
TFPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVEC  
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHODWLNGLKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS  
KTKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYK  
TTPPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H5

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYY  
ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDIWTGYGYWGQGLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH  
TFPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVEC  
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHODWLNGLKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS  
KTKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYK  
TTPPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Parejas de fusión de agentes de unión específica

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

15 En un ejemplo, la bisagra del anticuerpo, las regiones CH2 y CH3 pueden fusionarse en el extremo o bien N-terminal o bien C-terminal de los polipéptidos como agentes de unión específica tales como un fragmento Fv o Fab anti-Ang-2 (obtenido, por ejemplo, a partir de una biblioteca de presentación en fago) usando métodos conocidos por el experto en la técnica. La proteína de fusión resultante puede purificarse mediante el uso de una columna de afinidad de proteína A o proteína G. Se ha encontrado que péptidos y proteínas fusionados a una región Fc presentan una semivida sustancialmente mayor *in vivo* que el homólogo no fusionado. Además, una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc que se produce de manera natural, o puede alterarse para mejorar determinadas cualidades, tales como cualidades terapéuticas, tiempo de circulación, disminuir problemas de agregación, etc. Otros ejemplos conocidos en la técnica incluyen aquellos en los que la región Fc, que puede ser humana o de otra especie, o puede ser sintética, se fusiona al extremo N-terminal de CD30L para tratar enfermedad de Hodgkin, linfoma anaplásico y leucemia de células T (patente estadounidense n.º 5.480.981), la región Fc se fusiona al receptor de TNF para tratar choque séptico [Fisher *et al.*, N Engl J Med, 334: 1697-1702 (1996)] y la región Fc se fusiona al receptor Cd4 para tratar SIDA [Capon *et al.*, Nature, 337: 525-31 (1989)].

25 Anticuerpos catalíticos son otro tipo de molécula de fusión e incluyen anticuerpos en los que uno o más restos citotóxicos, o más generalmente uno o más restos biológicamente activos, se unen al agente de unión específica. Véase por ejemplo Rader *et al.*, Chem Eur J 12:2091-2095 (2000). Agentes citotóxicos de este tipo mejoran la citotoxicidad mediada por anticuerpos, e incluyen restos tales como citocinas que estimulan directa o indirectamente la muerte celular, radioisótopos, fármacos quimioterápicos (incluyendo profármacos), toxinas bacterianas (por ejemplo exotoxina de *Pseudomonas*, toxina diftérica, etc.), toxinas vegetales (por ejemplo ricina, gelonina, etc.), conjugados químicos (por ejemplo, toxinas maitansinoides, caliqueamicina, etc.), radioconjugados, conjugados enzimáticos (conjugados de ARNasa, terapia de profármaco/enzima dirigida por anticuerpos [ADEPT]) y similares.

30 En un aspecto, el agente citotóxico puede "unirse" un componente de un anticuerpo biespecífico o multiespecífico mediante la unión de este agente a uno de los sitios de reconocimiento de antígenos alternativos en el anticuerpo. Como alternativa, pueden expresarse citotoxinas proteicas como proteínas de fusión con el agente de unión específica tras el ligamiento de un polinucleótido que codifica para la toxina a un polinucleótido que codifica para el agente de unión. Todavía en otra alternativa, el agente de unión específica puede modificarse covalentemente para

40 incluir la citotoxina deseada.

Ejemplos de tales proteínas de fusión son polipéptidos inmunogénicos, proteínas con semividas circulantes largas, tales como regiones constantes de inmunoglobulinas, proteínas marcadoras, proteínas o polipéptidos que facilitan la purificación del polipéptido como agente de unión específica deseado y secuencias de polipéptido que promueven la formación de proteínas multiméricas (tales como motivo de cremallera de leucinas que son útiles en la formación/estabilidad de dímeros).

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

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

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

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

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

#### Variantes de agentes de unión específica

Las variantes de agentes de unión específica descritos en el presente documento incluyen variantes de inserción, delección y/o sustitución. En un aspecto, se proporcionan variantes de inserción en las que uno o más residuos de aminoácido complementan una secuencia de aminoácidos de agente de unión específica. Las inserciones pueden estar ubicadas en cualquiera o ambos de los extremos terminales de la proteína, o pueden estar colocadas dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácidos de agente de unión específica. Las variantes de inserción con residuos adicionales en cualquiera o ambos de los extremos terminales pueden incluir, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcadores o etiquetas de aminoácidos. Las variantes de inserción incluyen polipéptidos como agentes de unión específica en los que se añaden uno o más residuos de aminoácido a una secuencia de aminoácidos de agente de unión específica, o fragmento de la misma.

Los productos variantes también incluyen productos de agente de unión específica maduros. Tales productos de agente de unión específica tienen las secuencias líder o señal eliminadas, sin embargo, la proteína resultante tiene

residuos amino-terminales adicionales en comparación con polipéptido Ang-2 de tipo natural. Los residuos amino-terminales adicionales pueden derivarse de otra proteína, o pueden incluir uno o más residuos que no pueden identificarse que se deriven de una proteína específica. Se contemplan productos de agente de unión específica con un residuo de metionina adicional en la posición -1 (Met<sup>-1</sup>-agente de unión específica), como también productos de agente de unión específica con residuos de metionina y lisina adicionales en las posiciones <sup>-2</sup> y <sup>-1</sup> (Met<sup>-2</sup>-Lys<sup>-1</sup>-agente de unión específica). Variantes de agentes de unión específica que tienen residuos de Met, Met-Lys, Lys adicionales (o uno o más residuos básicos en general) son particularmente útiles para la producción potenciada de proteínas recombinantes en células huésped bacterianas.

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

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

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

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

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

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

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

Determinados esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado la

- coincidencia de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta aún cuando no hay una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el método de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos el diez por ciento de la longitud completa del polipéptido
- 5 diana que está comparándose, es decir, al menos 40 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de al menos 400 aminoácidos, 30 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de al menos 300 a aproximadamente 400 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de 200 a aproximadamente 300 aminoácidos y al menos 10 aminoácidos contiguos cuando están comparándose secuencias de aproximadamente 100 a 200 aminoácidos.
- 10 Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), se alinean dos polipéptidos para los que va a determinarse el porcentaje de identidad de secuencia para lograr una coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos (el "tramo coincidente", tal como se determina mediante el algoritmo). En determinadas realizaciones, se usan conjuntamente con el algoritmo una penalización por apertura de huecos (que se calcula normalmente como 3X la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la
- 15 diagonal de la matriz de comparación que está usándose; la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada coincidencia de aminoácido perfecta por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de huecos (que es habitualmente 1/10 veces la penalización por apertura de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62. En determinadas realizaciones, el algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véase Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3) (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).
- 20 En determinadas realizaciones, los parámetros para una comparación de secuencias de polipéptido incluyen los siguientes:
- Algoritmo: Needleman *et al.*, J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970);
- 25 Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, citado anteriormente (1992);
- Penalización por hueco: 12
- Penalización por longitud de hueco: 4
- Umbral de similitud: 0
- 30 El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En determinadas realizaciones, los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto con ausencia de penalización para huecos de extremos) usando el algoritmo GAP.
- En determinadas realizaciones, los parámetros para comparaciones de secuencias de moléculas de polinucleótidos incluyen los siguientes:
- Algoritmo: Needleman *et al.*, citado anteriormente (1970);
- 35 Matriz de comparación: coincidencias = +10, coincidencia errónea = 0
- Penalización por hueco: 50
- Penalización por longitud de hueco: 3
- El programa GAP también puede ser útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de moléculas de polinucleótidos.
- 40 Pueden usarse otros algoritmos, penalizaciones por apertura de huecos, penalizaciones por extensión de huecos, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc. a modo de ejemplo, incluyendo los expuestos en el Program Manual, Wisconsin Package, versión 9, septiembre de 1997. Las elecciones particulares que van a realizarse resultarán evidentes para los expertos en la técnica y dependerán de la comparación específica que va a realizarse, tal como ADN con ADN, proteína con proteína, proteína con ADN; y, adicionalmente, de si la comparación es entre
- 45 pares de secuencias dados (en cuyo caso se prefieren generalmente GAP o BestFit) o entre una secuencia y una gran base de datos de secuencias (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).
- Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology--A Synthesis (2ª edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).
- 50 Los aminoácidos pueden tener estereoquímica o bien L o bien D (excepto por Gly, que no es ni L ni D) y los polipéptidos y las composiciones de la presente invención pueden comprender una combinación de estereoquímicas. Sin embargo, se prefiere la estereoquímica L. También se describen moléculas inversas en las que

la secuencia amino-terminal a carboxilo-terminal de los aminoácidos está invertida. Por ejemplo, la inversa de una molécula que tiene la secuencia normal  $X_1-X_2-X_3$  sería  $X_3-X_2-X_1$ . También se describen moléculas retroinversas en las que, como anteriormente, la secuencia amino-terminal a carboxilo-terminal de aminoácidos está invertida y los residuos son are normalmente enantiómeros "L" están alterados en la forma de estereoisómero "D".

5 Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos, N-alkilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen, sin limitación: ácido aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido aminobutírico, ácido piperidínico, ácido aminocaproico, ácido aminoheptanoico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, ornitina, 4-hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetil-lisina,  $\epsilon$ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina,  $\sigma$ -N-metilarginina y otros aminoácidos similares y aminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina).

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

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

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

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

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

30 3) ácidos: Asp, Glu;

4) básicos: His, Lys, Arg;

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

6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

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

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

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

- 5 Se han asignado los siguientes valores de hidrofiliía a estos residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al hacer cambios basándose en valores de hidrofiliía similares, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliía están dentro de ±2, en determinadas realizaciones, se incluyen aquellos que están dentro de ±1 y en determinadas realizaciones, se incluyen aquellos dentro de ±0,5. También pueden identificarse epítomos de secuencias de aminoácidos primarias basándose en la hidrofiliía. Estas regiones también se denominan "regiones de núcleo epitépico".
- 10 En la tabla 1 se exponen sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo.

Tabla 1  
Sustituciones de aminoácidos

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

- 15 Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido tal como se expone en el presente documento usando técnicas bien conocidas. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad seleccionando como diana regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. En determinadas realizaciones, pueden identificarse residuos y partes de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En determinadas realizaciones, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar de manera adversa a la estructura del polipéptido.
- 20 Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de una comparación de este tipo, puede predecirse la importancia de residuos de aminoácido en una proteína que corresponden a residuos de aminoácido que son importantes para la actividad o estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales residuos de aminoácido importantes previstos.
- 25 Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, un experto en la técnica puede predecir la alineación de residuos de aminoácido de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede elegir no hacer cambios radicales en residuos de aminoácido que se predice que están en la superficie de la proteína, puesto que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una única sustitución de aminoácidos en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes pueden seleccionarse entonces usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica.
- 30 Tales variantes podrían usarse para reunir información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular da como resultado actividad destruida, reducida de manera no deseada o inadecuada, pueden evitarse variantes con un cambio de este tipo. En otras palabras, basándose en la
- 35

información reunida a partir de tales experimentos de rutina, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse sustituciones adicionales o bien solas o bien en combinación con otras mutaciones.

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

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

25 En determinadas realizaciones, las variantes de anticuerpo incluyen variantes de glicosilación en las que el número y/o tipo de sitio de glicosilación se ha alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido original. En determinadas realizaciones, las variantes de proteínas comprenden un mayor o menor número de sitios de glicosilación unidos a N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácido para crear esta secuencia proporciona un posible nuevo sitio para la adición de una cadena de hidrato de carbono unida a N. Alternativamente, sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de hidrato de carbono unida a N existente. También se proporciona un reordenamiento de cadenas de hidrato de carbono unidas a N en el que se eliminan uno o más sitios de glicosilación unidos a N (normalmente los que se producen de manera natural) y se crean uno o más nuevos sitios unidos a N. Las variantes de anticuerpo preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que se delecionan uno o más residuos de cisteína o se sustituyen por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos original. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando deben replegarse anticuerpos para dar una conformación biológicamente activa tal como tras el aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen generalmente menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y tienen normalmente un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas desapareadas.

35 Según determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos son aquéllas que: (1) reducen la propensión a la proteólisis, (2) reducen la propensión a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión y/o (5) confieren o modifican otras propiedades funcionales en tales polipéptidos. Según determinadas realizaciones, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (en determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (en determinadas realizaciones, en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares). En determinadas realizaciones, normalmente una sustitución de aminoácidos conservativa puede no cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper la hélice que se produce en la secuencia original, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza a la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman y Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.* *Nature* 354:105 (1991).

50 Las moléculas de agente de unión específica descritas son variantes de sustitución de polipéptidos o péptidos que pueden tener hasta aproximadamente del diez al doce por ciento de la secuencia de aminoácidos original reemplazada. Para variantes de anticuerpo, la cadena pesada puede tener 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácidos reemplazados, mientras que la cadena ligera puede tener 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácidos reemplazados.

#### Derivados de agentes de unión específica

60 También se describen derivados de polipéptidos como agentes de unión específica. Los derivados incluyen polipéptidos como agentes de unión específica que llevan modificaciones distintas de inserción, deleción o sustitución de residuos de aminoácido. Preferiblemente, las modificaciones son de naturaleza covalente e incluyen,

por ejemplo, unión química con polímeros, lípidos, otros restos orgánicos e inorgánicos. Pueden prepararse derivados de la invención para aumentar la semivida circulante de un polipéptido como agente de unión específica, o pueden diseñarse para mejorar la capacidad de direccionamiento del polipéptido hacia células, tejidos u órganos deseados.

- 5 Se describen además agentes de unión derivados modificados covalentemente para incluir una o más uniones a polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol tal como se describe en las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup>: 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337. Todavía otros polímeros útiles conocidos en la técnica incluyen monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa u otros polímeros a base de hidratos de carbono, poli-(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y poli(alcohol vinílico), así como mezclas de estos polímeros. Se prefieren particularmente productos de agente de unión específica modificados covalentemente con subunidades de polietilenglicol (PEG). Pueden unirse polímeros solubles en agua en posiciones específicas, por ejemplo en el extremo amino-terminal de los productos de agente de unión específica, o unirse aleatoriamente a una o más cadenas laterales del polipéptido. El uso de PEG para mejorar la capacidad terapéutica del agente de unión específica, y de anticuerpos humanizados en particular, se describe en la patente estadounidense 6.133.426 concedida a Gonzales *et al.*, expedida el 17 de octubre de 2000.

#### Sitios diana para mutagénesis de anticuerpos

- 20 Pueden emplearse determinadas estrategias para manipular propiedades inherentes de un anticuerpo específico para Ang-1 y/o Ang-2, tal como la afinidad del anticuerpo por su diana. Estas estrategias incluyen el uso de mutagénesis al azar o específica de sitio de la molécula de polinucleótido que codifica para el anticuerpo para generar variantes de anticuerpos, seguido por una etapa de selección diseñada para recuperar variantes de anticuerpos que presentan el cambio deseado, por ejemplo afinidad aumentada o disminuida.

- 25 Los residuos de aminoácido más comúnmente seleccionados como diana en estrategias mutagénicas son aquellos que están en las CDR. Tal como se describió anteriormente, estas regiones contienen los residuos que interaccionan realmente con Ang-1 y/o Ang-2 y otros aminoácidos que afectan a la disposición espacial de estos residuos. Sin embargo, también se ha mostrado que los aminoácidos en las regiones de entramado de los dominios variables fuera de las regiones CDR hacen contribuciones sustanciales a las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo, y pueden seleccionarse como diana para manipular tales propiedades. Véase Hudson, *Curr Opin Biotech*, 9:395-402 (1999) y referencias en el mismo.

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

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

- 50 La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia y es la definición más comúnmente usada para predecir regiones CDR. [Johnson y Wu, *Nucleic Acids Res*, 28: 214-8 (2000)]. La definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucles estructurales. [Chothia *et al.*, *J Mol Biol*, 196: 901-17 (1986); Chothia *et al.*, *Nature*, 342: 877-83 (1989)]. La definición de AbM es un compromiso entre la definición de Kabat y Chothia. AbM es una serie integral de programas para el modelado de la estructura de anticuerpos producida por Oxford Molecular Group [Martin *et al.*, *Proc Natl Acad Sci (USA)* 86:9268-9272 (1989); Rees, *et al.*, ABM<sup>TM</sup>, a computer program for modeling variable regions of antibodies, Oxford, U.K.; Oxford Molecular, Ltd.]. La serie AbM modela la estructura terciaria de un anticuerpo a partir de la secuenciación primaria usando una combinación de bases de datos de conocimientos y métodos *ab initio*. Se ha introducido recientemente una definición adicional, conocida como la definición de contacto. [MacCallum *et al.*, *J Mol Biol*, 5:732-45 (1996)]. Esta definición se basa en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles.

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

- 5 La CDR-H1 tiene aproximadamente de 10 a 12 residuos de longitud y empieza normalmente 4 residuos después de una Cys según las definiciones de Chothia y AbM o normalmente 5 residuos más tarde según la definición de Kabat. La H1 va seguida normalmente por un Trp, normalmente Trp-Val, pero también Trp-Ile o Trp-Ala. La longitud de H1 es de aproximadamente 10 a 12 residuos según la definición de AbM mientras que la definición de Chothia excluye los últimos 4 residuos.
- 10 La CDR-H2 empieza normalmente 15 residuos después del final de H1 según la definición de Kabat y AbM. Los residuos que preceden a H2 son normalmente Leu-Glu-Trp-Ile-Gly aunque hay varias variaciones. H2 va seguida normalmente por la secuencia de aminoácidos Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala. Según la definición de Kabat, la longitud de la H2 es de aproximadamente 16 a 19 residuos mientras que la definición de AbM predice que la longitud es normalmente de 9 a 12 residuos.
- 15 La CDR-H3 empieza normalmente 33 residuos después del final de H2 y va precedida normalmente por la secuencia de aminoácidos (normalmente Cys-Ala-Arg). La H3 va seguida normalmente por la secuencia de aminoácidos -Gly. La longitud de H3 puede tener cualquiera entre 3 y 25 residuos.

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

La CDR-L2 empieza aproximadamente 16 residuos después del final de L1. Generalmente seguirá a los residuos Ile-Tyr, Val-Tyr, Ile-Lys o Ile-Phe. La longitud de CDR-L2 es de aproximadamente 7 residuos.

- 25 La CDR-L3 empieza normalmente 33 residuos después del final de L2 y normalmente sigue a una Cys. L3 va seguida normalmente por la secuencia de aminoácidos Phe-Gly-XXX-Gly. La longitud de L3 es de aproximadamente 7 a 11 residuos.

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

45 En un ejemplo, la patente estadounidense 5.565.332 concedida a Hoogenboom *et al.* expedida el 15 de octubre de 1996 ("Production of chimeric antibodies – a combinatorial approach") describe métodos para la producción de anticuerpos, y fragmentos de anticuerpo que tienen especificidad de unión similar que un anticuerpo original pero que tienen características humanas aumentadas. Se obtienen anticuerpos humanizados mediante intercambio de cadenas, usando, por ejemplo, tecnología de presentación en fago, y se combina un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera o pesada de un anticuerpo no humano específico para un antígeno de interés con un repertorio de dominios variables de cadena (ligera o pesada) complementarios humanos. Se identifican apareamientos híbridos que son específicos para el antígeno de interés y se combinan cadenas humanas de los apareamientos seleccionados con un repertorio de dominios variables complementarios humanos (pesados o ligeros). En otra realización, se combina un componente de una CDR de un anticuerpo no humano con un repertorio de partes de componentes de CDR de anticuerpos humanos. A partir de la biblioteca resultante de dímeros polipeptídicos de anticuerpos, se seleccionan híbridos y se usan en una segunda etapa de intercambio de humanización. Alternativamente, esta segunda etapa se elimina si el híbrido ya tiene un carácter lo suficientemente humano como para ser de valor terapéutico. También se describen métodos de modificación para aumentar el carácter humano. Véase también Winter, FEBS Letts 430:92-92 (1998).

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

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

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

20 En muchos casos, la humanización de anticuerpos da como resultado una pérdida de capacidad de unión a antígeno. Por tanto, es preferible "volver a mutar" el anticuerpo humanizado para incluir uno o más de los residuos de aminoácido encontrados en el anticuerpo original (lo más a menudo de roedor) en un intento por restaurar la afinidad de unión del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Saldanha *et al.*, Mol Immunol 36:109-19 (1999).

#### Miméticos de proteínas/análogos de agentes de unión específica no peptídicos

30 Además, también se contemplan análogos de péptidos de agentes de unión específica no peptídicos que proporcionan una estructura estabilizada o biodegradación reducida. Pueden prepararse análogos miméticos de péptidos de agentes de unión específica basándose en un péptido inhibidor seleccionado mediante reemplazo de uno o más residuos por restos no peptídicos. Preferiblemente, los restos no peptídicos permiten que el péptido conserve su conformación natural, o estabilizan una conformación preferida, por ejemplo, bioactiva, que conserva la capacidad para reconocer y unirse a Ang-1 y/o Ang-2. En un aspecto, el análogo/mimético resultante presenta una afinidad de unión aumentada por Ang-1 y/o Ang-2. Un ejemplo de métodos para la preparación de análogos miméticos no peptídicos a partir de péptidos de agente de unión específica se describe en Nachman *et al.*, Regul Pept 57:359-370 (1995). Si se desea, los péptidos de agente de unión específica pueden modificarse; por ejemplo, mediante glicosilación, amidación, carboxilación o fosforilación, o mediante la creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres, en particular ésteres C-terminales y derivados de N-acilo de los péptidos de la invención. Los péptidos de agente de unión específica también pueden modificarse para crear derivados de péptidos formando complejos covalentes o no covalentes con otros restos. Pueden prepararse complejos unidos covalentemente uniendo los restos químicos a grupos funcionales en las cadenas laterales de aminoácidos que comprenden los péptidos de agente de unión específica, o en el extremo N- o C-terminal.

45 En particular, se anticipa que los péptidos de agente de unión específica pueden conjugarse con un grupo indicador, incluyendo, pero sin limitarse a, un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima (por ejemplo, que cataliza una reacción colorimétrica o fluorimétrica), un sustrato, una matriz sólida o un portador (por ejemplo, biotina o avidina). La invención proporciona por consiguiente una molécula que comprende una molécula de anticuerpo, en la que la molécula comprende además preferiblemente un grupo indicador seleccionado del grupo que consiste en un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima, un sustrato, una matriz sólida y un portador. Tales marcadores los conocen bien los expertos en la técnica, por ejemplo, se contemplan particularmente marcadores de biotina. El uso de tales marcadores lo conocen bien los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 3.817.837; la patente estadounidense n.º 3.850.752; la patente estadounidense n.º 3.996.345 y la patente estadounidense n.º 4.277.437. Otros marcadores que serán útiles incluyen, pero no se limitarán a, marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes y marcadores quimioluminiscentes. Las patentes estadounidenses que se refieren al uso de tales marcadores incluyen por ejemplo la patente estadounidense n.º 3.817.837; la patente estadounidense n.º 3.850.752; la patente estadounidense n.º 3.939.350 y la patente estadounidense n.º 3.996.345. Cualquiera de los péptidos puede comprender uno, dos o más de cualquiera de estos marcadores.

#### Métodos de preparación de agentes de unión específica

- Pueden prepararse agentes de unión específica de la presente invención que son proteínas mediante síntesis química en disolución o sobre un soporte sólido según técnicas convencionales. El límite actual para la síntesis en fase sólida es de aproximadamente 85-100 aminoácidos de longitud. Sin embargo, pueden usarse a menudo técnicas de síntesis química para ligar químicamente una serie de péptidos más pequeños para generar polipéptidos de longitud completa. Están disponibles comercialmente diversos sintetizadores automáticos y pueden usarse según protocolos conocidos. Véanse, por ejemplo, Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed., Pierce Chemical Co., (1984); Tam *et al.*, *J Am Chem Soc*, 105:6442, (1983); Merrifield, *Science*, 232:341-347, (1986); y Barany y Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, Nueva York, 1-284; Barany *et al.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 30, 705-739 (1987); y la patente estadounidense n.º 5.424.398.
- Los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida usan un co-poli(estireno-divinilbenceno) que contiene aminos 0,1-1,0 mM/g de polímero. Estos métodos para la síntesis de péptidos usan protección con butiloxicarbonilo (t-BOC) o 9-fluorenilmetiloxi-carbonilo (FMOC) de grupos alfa-amino. Ambos métodos implican síntesis graduales mediante las cuales se añade un único aminoácido en cada etapa partiendo del extremo C-terminal del péptido (véase Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991, unidad 9). Al finalizar la síntesis química, el péptido sintético puede desprotegerse para eliminar los grupos de bloqueo de aminoácidos t-BOC o FMOC y escindirse del polímero mediante tratamiento con ácido a temperatura reducida (por ejemplo, HF líquido-anisol al 10% durante de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 hora a 0°C). Tras la evaporación de los reactivos, se extraen los péptidos de agente de unión específica del polímero con disolución de ácido acético al 1% que entonces se liofiliza para producir el material bruto. Éste puede purificarse normalmente mediante técnicas tales como filtración en gel sobre Sephadex G-15 usando ácido acético al 5% como disolvente. La liofilización de fracciones apropiadas de la columna producirá el péptido o derivados de péptidos de agente de unión específica homogéneos, que entonces pueden caracterizarse mediante técnicas convencionales tales como análisis de aminoácidos, cromatografía en capa fina, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectroscopía de absorción ultravioleta, rotación molar, solubilidad y cuantificarse mediante la degradación de Edman en fase sólida.
- La síntesis química de anticuerpos anti-Ang-1 y/o anti-Ang-2, derivados, variantes y fragmentos de los mismos, así como otros agentes de unión a Ang-2 a base de proteínas permite la incorporación de aminoácidos que no se producen de manera natural en el agente.
- Las técnicas de ADN recombinante son un método conveniente para preparar anticuerpos de longitud completa y otros agentes de unión específica proteicos grandes, o fragmentos de los mismos. Puede insertarse una molécula de ADNc que codifica para el anticuerpo o fragmento en un vector de expresión, que a su vez puede insertarse en una célula huésped para la producción del anticuerpo o fragmento. Se entiende que los ADNc que codifican para tales anticuerpos pueden modificarse para variar con respecto al ADNc "original" (traducido a partir del ARNm) para proporcionar degeneración de codones o para permitir un uso de preferencia de codones en diversas células huésped.
- Generalmente, puede obtenerse una molécula de ADN que codifica para un anticuerpo usando procedimientos descritos en el presente documento en los ejemplos. Cuando es deseable obtener moléculas de Fab o CDR que están relacionadas con la molécula de anticuerpo original, puede examinarse una biblioteca adecuada (biblioteca de presentación en fago; biblioteca de linfocitos, etc.) usando técnicas convencionales para identificar y clonar Fab/CDR relacionados. Las sondas usadas para tal examen pueden ser sondas de Fab truncadas o de longitud completa que codifican para la parte de Fab del anticuerpo original, sondas contra una o más CDR de la parte de Fab del anticuerpo original u otras sondas adecuadas. Cuando se usan fragmentos de ADN como sondas, condiciones de hibridación típicas son aquellas tal como se expone en Ausubel *et al.* (*Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols Press [1994]). Tras la hibridación, la transferencia analizada con sonda puede lavarse a una rigurosidad adecuada, dependiendo de factores tales como el tamaño de la sonda, la homología esperada de la sonda con el clon, el tipo de biblioteca que está examinándose y el número de clones que están examinándose. Ejemplos de examen de alta rigurosidad son 0,1 X SSC y SDS al 0,1 por ciento a una temperatura entre 50-65°C.
- Puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión/huésped para contener y expresar las moléculas de polinucleótido que codifican para los polipéptidos de agente de unión específica de la invención. Estos sistemas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de cósmidos, plásmidos o bacteriófagos recombinantes; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transfectadas con sistemas de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, VMT) o transformadas con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células animales.
- Las células de mamífero que son útiles en producciones de proteínas como agentes de unión específica recombinantes incluyen, pero no se limitan a, células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293, así como líneas celulares de hibridoma tal como se describe en el presente documento. Se prefieren células de mamífero para la preparación de los agentes de unión específica tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que normalmente están glicosilados y requieren un repliegamiento apropiado para su actividad. Las células de mamífero preferidas incluyen células CHO, células de hibridoma y células mieloides.

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

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

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

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

Alternativamente, el ADNc que codifica para el péptido de agente de unión específica puede clonarse en el vector de expresión de baculovirus pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Este vector puede usarse según las directrices del fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* células en medios libres de proteína sF9 y para producir proteína recombinante. La proteína como agente de unión específica puede purificarse y concentrarse a partir de los medios usando una columna de heparina-Sepharose (Farmacia).

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

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

La expresión de polinucleótidos que codifican para anticuerpos anti-Ang-1 y/o anti-Ang-2 y fragmentos de los mismos usando los sistemas recombinantes descritos anteriormente pueden dar como resultado la producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos que deben “replegarse” (para crear apropiadamente diversos puentes disulfuro) con el fin de que sean biológicamente activos. En los ejemplos en el presente documento y en la siguiente sección se exponen procedimientos de replegamiento típicos para tales anticuerpos.

Pueden producirse agentes de unión específica preparados en células bacterianas como un cuerpo de inclusión insoluble en las bacterias y purificarse tal como sigue. Pueden sacrificarse células huésped mediante centrifugación; lavarse en NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; y tratarse con lisozima 0,1 mg/ml (Sigma, St. Louis; MO) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El lisado puede clarificarse mediante sonicación, y los residuos celulares pueden sedimentarse mediante centrifugación durante 10 minutos a 12.000 X g. El sedimento que contiene agente de unión específica puede resuspenderse en Tris 50 mM, pH 8 y EDTA 10 mM, estratificarse sobre glicerol al 50% y centrifugarse durante 30 min. a 6000 X g. El sedimento puede resuspenderse en solución salina tamponada con fosfato (PBS) convencional libre de Mg<sup>++</sup> y Ca<sup>++</sup>. El agente de unión específica puede purificarse adicionalmente

fraccionando el sedimento resuspendido en un gel de SDS-poliacrilamida desnaturalizante (Sambrook *et al.*, citado anteriormente). El gel puede empaparse en KCl 0,4 M para visualizar la proteína, que puede escindirse y someterse a electroelución en tampón de ejecución en gel que carece de SDS. Si la proteína de fusión de GST se produce en bacterias, como una proteína soluble, puede purificarse usando el módulo de purificación de GST (Pharmacia).

5 Los expertos en la técnica conocen bien sistemas de huésped de mamífero para la expresión de la proteína recombinante. Pueden elegirse cepas de células huésped para lograr una capacidad particular para procesar la proteína expresada o producir determinadas modificaciones postraduccionales que serán útiles para proporcionar actividad de la proteína. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Diferentes células huésped tales como CHO, HeLa, 10 MOCK, 293, WI38, así como líneas celulares de hibridoma, y similares tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y pueden elegirse para garantizar el procesamiento y la modificación correctos de la proteína foránea introducida.

Pueden usarse varios sistemas de selección para recuperar las células que se han transformado para la producción de proteína recombinante. Tales sistemas de selección incluyen, pero no se limitan a, genes de timidina cinasa de 15 VHS, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa, en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse la resistencia a anticuerpos anti-metabolitos como base de selección de DHFR que confiere resistencia a metotrexato; gpt que confiere resistencia a ácido micofenólico; neo que confiere resistencia al aminoglicósido G418 y confiere resistencia a clorsulfurón; e hygro que confiere resistencia a higromicina. Los genes seleccionables adicionales que pueden ser útiles incluyen trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina. Los 20 marcadores que proporcionan una indicación visual para la identificación de transformantes incluyen antocianinas,  $\beta$ -glucuronidasa y su sustrato, GUS, y luciferasa y su sustrato, luciferina.

#### Purificación y replegamiento de agentes de unión específica

En algunos casos, puede ser necesario "replegar" y oxidar los agentes de unión específica producidos usando 25 procedimientos descritos anteriormente para dar una estructura terciaria apropiada y generar enlaces disulfuro con el fin de ser biológicamente activos. El replegamiento puede lograrse usando varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, exponer el agente polipeptídico solubilizado a un pH habitualmente superior a 7 en presencia de un agente caotrópico. La selección de caótropro es similar a las elecciones usadas para la solubilización de cuerpos de inclusión, sin embargo un caótropro se usa normalmente a 30 una concentración inferior. Un agente caotrópico a modo de ejemplo es guanidina. En la mayoría de los casos, la disolución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor más su forma oxidada en una razón específica para generar un potencial redox particular que permite que se produzca el reordenamiento de enlaces disulfuro para la formación de puentes de cisteína. Algunos pares redox comúnmente usados incluyen cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditiotreitól-DTT/ditiano-DTT y 2-mercaptoetanol (bME)/ditiobME. En muchos casos, puede usarse un co-disolvente para aumentar la eficacia del replegamiento. Los co- 35 disolventes comúnmente usados incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y arginina.

Será deseable purificar proteínas de agentes de unión específicas o variantes de las mismas. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas de purificación de proteínas. Estas técnicas implican, a un nivel, el fraccionamiento 40 bruto de las fracciones polipeptídicas y no polipeptídicas. Habiendo separado el polipéptido como agente de unión específica de otras proteínas, el polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para alcanzar una purificación parcial o completa (o purificación hasta la homogeneidad). Métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido como agente de unión específica puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida; isoelectroenfoque. Un método particularmente eficaz de purificación de péptidos es cromatografía de 45 líquidos rápida de proteínas o incluso HPLC.

Determinados aspectos de la presente invención se refieren a la purificación, y en realizaciones particulares, la purificación sustancial, de un anticuerpo codificado. Se pretende que el término "proteína o péptido como agente de unión específica purificado" tal como se usa en el presente documento, se refiera a una composición que puede aislarse de otros componentes, en la que la proteína o el péptido como agente de unión específica se purifica hasta 50 cualquier grado con respecto a su estado que puede obtenerse de manera natural. Una proteína o un péptido como agente de unión específica purificado también se refiere por tanto a una proteína o a un péptido como agente de unión específica libre del entorno en el que puede producirse de manera natural.

Generalmente, "purificado" se referirá a una composición de agente de unión específica que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar diversos otros componentes, y composición que conserva sustancialmente su 55 actividad biológica expresada. Cuando se usa el término "sustancialmente purificado", esta denominación se referirá a una composición de agente de unión específica en la que la proteína o el péptido como agente de unión específica forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o más de la proteínas en la composición.

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

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

20 No hay un requisito general de que el agente de unión específica siempre tenga que proporcionarse en su estado más purificado. De hecho, se contempla que productos de agentes de unión específica sustancialmente menos puros tendrán utilidad en determinadas realizaciones. Puede lograrse purificación parcial usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada usando un aparato de HPLC dará generalmente como resultado una purificación de más “veces” que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que muestran un grado inferior de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total de producto de proteína como agente de unión específica, o en el mantenimiento de la actividad de unión de una proteína como agente de unión específica expresado.

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

#### Ensayos de unión

35 Los ensayos de unión inmunológicos utilizan normalmente un agente de captura para unirse específicamente al, y a menudo inmovilizar el antígeno diana como analito. El agente de captura es un resto que se une específicamente al analito. En una realización de la presente invención, el agente de captura es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a Ang-2 y/o Ang-1. Estos ensayos de unión inmunológicos se conocen bien en la técnica [véase, Asai, ed., Methods in Cell Biology, vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., Nueva York (1993)].

40 Los ensayos de unión inmunológicos utilizan frecuentemente un agente de marcaje que indicará la existencia del complejo unido formado por el agente de captura y el antígeno. El agente de marcaje puede ser una de las moléculas que comprende el complejo unido; es decir, puede ser un agente de unión específica marcado o un anticuerpo anti-agente de unión específica marcado. Alternativamente, el agente de marcaje puede ser una tercera molécula, comúnmente otro anticuerpo, que se une al complejo unido. El agente de marcaje puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-agente de unión específica que lleva un marcador. El segundo anticuerpo, específico para el complejo unido, puede carecer de marcador, pero puede estar unido a una cuarta molécula específica para la especie de anticuerpos de la que es un miembro el segundo anticuerpo. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede estar modificado con un resto detectable, tal como biotina, a la que entonces puede unirse una cuarta molécula, tal como estreptavidina marcada con enzima. También pueden usarse otras proteínas que pueden unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G, como agente de marcaje. Estas proteínas de unión son constituyentes normales de las paredes celulares de bacterias estreptocócicas y muestran una fuerte reactividad no inmunogénica con regiones constantes de inmunoglobulina de una variedad de especies [véase, generalmente Akerstrom, J Immunol, 135:2589-2542 (1985); y Chaubert, Mod Pathol, 10:585-591 (1997)].

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

A. Ensayos de unión no competitivos:

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

B. Ensayos de unión competitivos:

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

En otro ensayo de unión competitivo preferido, el anticuerpo se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La cantidad de proteína unida al anticuerpo puede determinarse o bien midiendo la cantidad de proteína presente en un complejo de proteína/anticuerpo o bien alternativamente midiendo la cantidad de proteína no complejada restante. La cantidad de proteína puede detectarse proporcionando una proteína marcada. Véase, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, capítulo 14, citado anteriormente).

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

C. Uso de ensayos de unión competitivos:

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

D. Otros ensayos de unión:

Pueden usarse métodos de inmunotransferencia de tipo Western para detectar o cuantificar la presencia de Ang-1 y/o Ang-2 en una muestra. La técnica comprende generalmente separar proteínas de muestra mediante electroforesis en gel basándose en el peso molecular y transferir la proteínas a un soporte sólido adecuado, tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o un filtro de nailon derivatizado. La muestra se incubaba con anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a Ang-1 y/o Ang-2 y se detecta el complejo resultante. Estos anticuerpos pueden estar directamente marcados o alternativamente pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados que se unen específicamente al anticuerpo.

En los ejemplos en el presente documento, se exponen ensayos de unión para detectar los agentes de unión específica a Ang-1 y/o Ang-2 que alteran la unión de Ang-2 a su receptor.

Ensayos de diagnóstico

Los anticuerpos o fragmentos de unión antígeno de los mismos de la presente invención son útiles para el diagnóstico de estados o enfermedades caracterizados por la expresión de Ang-1 y/o Ang-2 o subunidades, o en ensayos para monitorizar a pacientes que están tratándose con inductores de Ang-1 y/o Ang-2, sus fragmentos,

- agonistas o inhibidores de la actividad de Ang-1 y/o Ang-2. Los ensayos de diagnóstico para Ang-1 y/o Ang-2 incluyen métodos que utilizan un agente de unión específica y un marcador para detectar Ang-1 y/o Ang-2 en fluidos corporales humanos o extractos de células o tejidos. Los agentes de unión específica pueden usarse con o sin modificación. En un ensayo de diagnóstico preferido, los agentes de unión específica se marcarán mediante fijación, por ejemplo, de un marcador o una molécula indicadora. Se conoce una amplia variedad de marcadores y moléculas indicadoras, algunos de los cuales ya se han descrito en el presente documento. En particular, la presente invención es útil para el diagnóstico de una enfermedad de seres humanos.
- En la técnica se conoce una variedad de protocolos para medir proteínas Ang-1 y/o Ang-2 usando anticuerpos o bien policlonales o bien monoclonales específicos para la proteína respectiva. Los ejemplos incluyen ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales, con dos sitios, que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos frente a dos epítomos que no interfieren en Ang-1 y/o Ang-2, pero puede emplearse un ensayo de unión competitivo. Estos ensayos se describen, por ejemplo, en Maddox *et al.*, J Exp Med, 158:1211 [1983].
- Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico, habitualmente se establecen valores normales o convencionales para la expresión de Ang-1 y/o Ang-2 humana. Esta determinación puede lograrse combinando fluidos corporales o extractos celulares de sujetos normales, preferiblemente seres humanos, con un agente de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo, frente a Ang-1 y/o Ang-2, en condiciones adecuadas para la formación de complejos que se conocen bien en la técnica. La cantidad de formación de complejo convencional puede cuantificarse comparando la unión de los agentes de unión específica con cantidades conocidas de proteína Ang-1 y/o Ang-2, con muestras tanto de control como de enfermedad. Entonces, pueden compararse valores convencionales obtenidos a partir de muestras normales con valores obtenidos a partir de muestras de sujetos posiblemente afectados por una enfermedad. La desviación entre los valores convencionales y de sujetos sugiere un papel de Ang-1 y/o Ang-2 en el estado patológico.
- Para aplicaciones de diagnóstico, en determinadas realizaciones, normalmente se marcarán agentes de unión específica con un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que pueda producir, o bien directa o bien indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^{125}\text{I}$ , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, P-galactosidasa o peroxidasa del rábano [Bayer *et al.*, Meth Enz, 184: 138-163, (1990)].

#### Enfermedades

- La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a Ang-1 y/o Ang-2 que es útil para el tratamiento de estados patológicos y enfermedades de seres humanos. Pueden usarse agentes que modulan la actividad de unión a Ang-1 y/o Ang-2, u otra actividad celular, en combinación con otros agentes terapéuticos para potenciar sus efectos terapéuticos o disminuir sus posibles efectos secundarios.
- En un aspecto, la presente invención proporciona reactivos y usos para tratar enfermedades y estados caracterizados por niveles no deseables o aberrantes de actividad de Ang-1 y/o Ang-2 en una célula. Estas enfermedades incluyen cánceres y otros estados hiperproliferativos, tales como hiperplasia, psoriasis, dermatitis de contacto, trastornos inmunológicos y esterilidad.
- Se describen métodos de tratamiento de cáncer en un animal, incluyendo seres humanos, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de un agente de unión específica que inhibe o disminuye la actividad de Ang-1 y/o Ang-2. También se describen métodos de inhibición del crecimiento de células cancerosas, incluyendo procesos de proliferación celular, invasividad y metástasis en sistemas biológicos. Los métodos incluyen el uso de un compuesto de la invención como inhibidor del crecimiento de células cancerosas. Preferiblemente, los anticuerpos se usan para inhibir o reducir el crecimiento de células cancerosas, la invasividad, la metástasis o la incidencia de tumores en animales vivos, tales como mamíferos. Los métodos descritos también pueden adaptarse fácilmente para su uso en sistemas de ensayo, por ejemplo, someter a ensayo el crecimiento de células cancerosas y propiedades de las mismas, así como identificar compuestos que afectan al crecimiento de células cancerosas.
- Los cánceres que pueden tratarse mediante los presentes métodos se producen preferiblemente en mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos y otros primates, así como mascotas o animales de compañía tales como perros y gatos, animales de laboratorio tales como ratas, ratones y conejos, y animales de granja tales como caballos, cerdos, ovejas y ganado.
- Los tumores o neoplasmas incluyen crecimientos de células tisulares en los que la multiplicación de las células no está controlada y es progresiva. Algunos de tales crecimientos son benignos, pero otros se denominan malignos y pueden conducir a la muerte del organismo. Los neoplasmas o cánceres malignos se distinguen de los crecimientos benignos porque, además de mostrar proliferación celular agresiva, pueden invadir tejidos circundantes y metastatizarse. Además, los neoplasmas malignos se caracterizan porque muestran una mayor pérdida de diferenciación (mayor desdiferenciación) y de su organización entre sí y sus tejidos circundantes. Esta propiedad

también se denomina “anaplasia”.

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

El tipo de células cancerosas o tumorales que pueden someterse a tratamiento según la invención incluyen, por ejemplo, tumor que produce ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cáncer colorrectal, linfoma de células T cutáneo, cáncer endometrial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas y no pequeñas), efusión peritoneal maligna, efusión pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, glioma, linfoma no Hodgkin, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de ovario (de células germinales), cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de próstata, retinoblastoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinomas de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, neoplasmas trofoblásticos, cáncer de útero, cáncer de vagina, cáncer de la vulva y tumor de Wilms.

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

La invención también puede ponerse en práctica incluyendo con un agente de unión específica de la invención, un anticuerpo, en combinación con otro agente quimioterápico anticancerígeno, tal como cualquier agente quimioterápico convencional. La combinación de un agente de unión específica con tales otros agentes puede potenciar el protocolo quimioterápico. Al médico experto se le ocurrirán numerosos protocolos quimioterápicos que pueden incorporarse en el método de la invención. Puede usarse cualquier agente quimioterápico, incluyendo agentes alquilantes, antimetabolitos, hormonas y antagonistas, radioisótopos, así como productos naturales. Por ejemplo, el compuesto de la invención puede administrarse con antibióticos tales como doxorubicina y otros análogos de antraciclina, mostazas de nitrógeno tales como ciclofosfamida, análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo, cisplatino, hidroxiaurea, taxol y sus derivados naturales y sintéticos, y similares. Como otro ejemplo, en el caso de tumores mixtos, tales como adenocarcinoma de mama, en los que los tumores incluyen células dependientes de gonadotropina e independientes de gonadotropina, el compuesto puede administrarse junto con leuprolida o goserelina (análogos peptídicos sintéticos de LH-RH). Otros protocolos antineoplásicos incluyen el uso de un compuesto de tetraciclina con otra modalidad de tratamiento, por ejemplo, cirugía, radiación, etc., también denominadas en el presente documento “modalidades antineoplásicas complementarias”. Por tanto, el método de la invención puede emplearse con tales regímenes convencionales con el beneficio de reducir los efectos secundarios y potenciar la eficacia.

La presente invención proporciona por tanto composiciones para el tratamiento de una amplia variedad de cánceres, incluyendo tumores sólidos y leucemias. Los tipos de cáncer que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a: adenocarcinoma de mama, próstata y colon; todas las formas de carcinoma broncogénico de pulmón; mieloma; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; branquioma; síndrome carcinoide maligno; cardiopatía carcinoide; carcinoma (por ejemplo, de Walker, de célula basales, basoescomoso, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, Krebs 2, de células de Merkel, mucinoso, de pulmón de células no pequeñas, de células en granos de avena, papilar, escirroso, bronquiolar, broncogénico, de células escamosas y de células transicionales); trastornos histiocíticos; leucemia; histiocitosis maligna; enfermedad de Hodgkin; carcinoma de pulmón de células pequeñas inmunoproliferativo; linfoma no Hodgkin; plasmacitoma; reticuloendoteliosis; melanoma; condroblastoma; condroma; condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumores de células gigantes; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; cordoma; craneofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefoma; miosarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; tumor trofoblástico. Además, también pueden tratarse los siguientes tipos de cánceres: adenoma; colangioma; colesteatoma; cilindroma; cistadenocarcinoma; cistadenoma; tumor de células granulares; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumor de células del islote; tumor de células de Leydig; papiloma; tumor de células de Sertoli; tumor de células tecales; leiomioma; leiomiosarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rabiomioma; rabiomiosarcoma;ependimoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitelioma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma no cromafín; angioqueratoma; hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatosis; glomangioma;

hemangioendotelioma; hemangioma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; linfangioma; linfangiomioma; linfangiosarcoma; pinealoma; carcinosarcoma; condrosarcoma; cistosarcoma filoides; fibrosarcoma; hemangiosarcoma; leiomiosarcoma; leucosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; miosarcoma; mixosarcoma; carcinoma de ovario; rabdiosarcoma; sarcoma; neoplasmas; neurofibromatosis y displasia de cuello uterino.

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

15 Otros aspectos descritos en el presente documento incluyen tratar diversas retinopatías (incluyendo retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad) en las que está implicada la angiogénesis, así como trastornos/enfermedades de las vías reproductoras femeninas tales como endometriosis, fibroides uterinos y otros estados de este tipo asociados con proliferación vascular disfuncional (incluyendo crecimiento microvascular endometrial) durante el ciclo reproductor femenino.

20 Todavía otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a tratar un crecimiento vascular anómalo incluyendo malformaciones arteriovenosas cerebrales (AVM), lesión y reparación de la mucosa gastrointestinal, úlceras de la mucosa gastroduodenal en pacientes con historia de enfermedad por úlceras pépticas, incluyendo isquemia resultante de accidente cerebrovascular, un amplio espectro de trastornos vasculares pulmonares en enfermedad hepática e hipertensión portal en pacientes con hipertensión portal no hepática.

25 Otro aspecto descrito en el presente documento es la prevención de cánceres usando las composiciones y los métodos proporcionados por la presente invención. Tales reactivos incluirán agentes de unión específica contra Ang-2.

Composiciones farmacéuticas

30 Las composiciones farmacéuticas de anticuerpos frente a Ang-1 y/o Ang-2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos están dentro del alcance de la presente invención. Se describen en detalle composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.171.586, concedida a Lam *et al.*, expedida el 9 de enero de 2001. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profiláctica eficaz de un agente de unión específica, tal como un anticuerpo, o un fragmento, variante, derivado o fusión del mismo tal como se describe en el presente documento, en mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden agentes de unión específica antagonistas que modulan parcial o completamente al menos una actividad biológica de Ang-1 y/o Ang-2 en mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable. Normalmente, los agentes de unión específica se purificarán lo suficiente como para su administración a un animal.

40 La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina), agentes quelantes [tales como ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA)]; agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; 45 disacáridos y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); colorantes; agentes aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones de formación de sales (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenilílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); 50 disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como Pluronic, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, Triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos (preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de suministro; 55 diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

La composición farmacéutica óptima la determinará un experto en la técnica dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente. Tales composiciones pueden influir sobre el estado físico, la

estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* del agente de unión específica.

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

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

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

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

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

30 En otra realización, puede formularse una composición farmacéutica para su inhalación. Por ejemplo, puede formularse un agente de unión como polvo seco para inhalación. También pueden formularse disoluciones para inhalación de moléculas de ácido nucleico o polipéptidos con un propelente para la administración mediante aerosol. Aún en otra realización, pueden nebulizarse disoluciones. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la solicitud PCT n.º WO/1994/020069, que describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

35 También se contempla que determinadas formulaciones pueden administrarse por vía oral. En una realización, pueden formularse moléculas de agente de unión que se administran de esta manera con o sin los portadores habitualmente usados en la composición de formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula de agente de unión. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

40 También pueden formularse composiciones farmacéuticas para su administración oral usando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para su administración oral. Tales portadores permiten formular las composiciones farmacéuticas como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para su ingesta por el paciente.

- 5 Pueden obtenerse preparaciones farmacéuticas para su uso oral mediante la combinación de compuestos activos con excipiente sólido y el procesamiento de la mezcla resultante de gránulos (opcionalmente, tras la trituración) para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Pueden añadirse agentes auxiliares adecuados, si se desea. Los excipientes adecuados incluyen cargas de proteínas o hidratos de carbono, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa, tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; gomas, incluyendo arábica y tragacanto; y proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, pueden añadirse agentes de disgregación o solubilización, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar y ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.
- 10 Pueden usarse núcleos de grageas junto con recubrimientos adecuados, tales como disoluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad compuesto activo, es decir, la dosificación.
- 15 Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral también incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas, hechas de gelatina y un recubrimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener principios activos mezclados con cargas o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquidos o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.
- 20 Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de agente de unión en mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse disoluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes de unión, tales como almidón, gelatina o goma arábica; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.
- 25 A los expertos en la técnica les resultarán evidentes composiciones farmacéuticas adicionales, incluyendo formulaciones que implican moléculas de agente de unión en formulaciones de administración sostenida o controlada. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores liposómicos, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase por ejemplo el documento WO1993015722 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (documentos U.S. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-L-glutamato de etilo [Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)], poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) [Langer *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 15:167-277, (1981)] y [Langer *et al.*, *Chem Tech*, 12:98-105(1982)], etileno-acetato de vinilo (Langer *et al.*, citado anteriormente) o poli-D(-)-ácido 3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también incluyen liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Eppstein *et al.*, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 82:3688-3692 (1985); documentos EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.
- 30 Normalmente, la composición farmacéutica que va a usarse para su administración *in vivo* debe ser estéril. Esto puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando se liofiliza la composición, la esterilización usando este método puede realizarse o bien antes o bien después de la liofilización y reconstitución. La composición para su administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en disolución. Además,
- 35 generalmente se colocan composiciones parenterales en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica.
- 40 Una vez formulada la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido o polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse o bien en una forma lista para usarse o bien en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere su reconstitución antes de la administración.
- 45 En una realización específica, se contemplan kits para producir una unidad de administración de una dosis única. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína secada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. También se incluyen kits que contienen jeringas previamente llenadas de una única y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas para líquidos y jeringas Lyosyringe).
- 55 La cantidad eficaz de una composición farmacéutica que va a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán por tanto dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que está usándose la molécula de agente de unión, la vía de administración y el tamaño (peso corporal,

superficie corporal o tamaño de órgano) y estado (la edad y la salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede ajustar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede oscilar entre 0,1 mg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg; o entre 1 mg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg; o entre 5 mg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg.

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

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

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de agente de unión en la formulación usada. Normalmente, se administra una composición hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. Por tanto, la composición puede administrarse como una dosis única o como múltiples dosis (a las mismas o a diferentes concentraciones/dosificaciones) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua. De manera rutinaria se realiza un refinamiento adicional de la dosificación apropiada. Pueden determinarse dosificaciones apropiadas mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

La vía de administración de la composición farmacéutica es según métodos conocidos, por ejemplo por vía oral, mediante inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, por vía intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, uretral, vaginal o medios rectales, mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.

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

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

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

#### Terapia de combinación

Pueden usarse agentes de unión específica de la invención en combinación con otro componente terapéutico en el tratamiento de patologías de Ang-1 y/o Ang-2. Estos otros componentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, tratamiento por radiación, agentes quimioterápicos, así como otros factores de crecimiento o inhibidores.

El tratamiento por quimioterapia puede emplear agentes antineoplásicos incluyendo, por ejemplo, agentes alquilantes incluyendo: mostazas de nitrógeno, tales como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y clorambucilo; nitrosoureas, tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (metil-CCNU); etileniminas/metilmelamina tal como trietilenmelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametilmelamina (HMM, altretamina); sulfonatos de alquilo tales como busulfano; triazinas tales como dacarbazina (OTIC); antimetabolitos incluyendo análogos de ácido fólico tales como metotrexato y trimetrexato, análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, gemcitabina, arabinósido de citosina (AraC, citarabina), 5-azacitidina,

2,2'-difluorodesoxicitidina, análogos de purina tales como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxiniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA); productos naturales incluyendo fármacos antimitóticos tales como paclitaxel, alcaloides de la vinca incluyendo vinblastina (VLB), vincristina y vinorelbina, Taxotere, estramustina y fosfato de estramustina; podofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como actinomicina D, daunomicina (rubidomicina), doxorubicina, mitoxantrona, idarubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C y actinomicina; enzimas tales como L-asparaginasa; modificadores de la respuesta biológica tales como interferón-alfa, IL-2, G-CSF y GM-CSF; agentes misceláneos incluyendo complejos de coordinación de platino tales como cisplatino y carboplatino, antracenedionas tales como mitoxantrona, urea sustituida tal como hidroxiaurea, derivados de metilhidrazina incluyendo N-metilhidrazina (MIH) y procarbazona, supresores adrenocorticales tales como mitotano (o,p'-DOD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas incluyendo antagonistas de adrenocorticosteroides tales como prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; progestina tal como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol; estrógeno tal como dietilstilbestrol y equivalentes de etinil-estradiol; antiestrógenos tal como tamoxifeno; andrógenos incluyendo propionato de testosterona y fluoximesterona/equivalentes; antiandrógenos tales como flutamida, análogos de hormona liberadora de gonadotropina y leuprolida; y antiandrógenos no esteroideos tales como flutamida.

La terapia de combinación puede realizarse junto con los factores de crecimiento enumerados a continuación o con agentes que están diseñados para inhibir los factores de crecimiento enumerados a continuación. Los factores de crecimiento incluyen citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, factor de células madre y eritropoyetina. Otras composiciones pueden incluir angiopoyetinas conocidas, por ejemplo Ang-1, 2, 4, Y y/o el polipéptido similar a Ang humana, y/o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los factores de crecimiento incluyen angiogenina, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor de proteína morfogénica ósea IA, receptor de proteína morfogénica ósea IB, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina 1, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina 2, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina 2, factor de crecimiento de células endoteliales, endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, atrayente de neutrófilos derivado del epitelio, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de fibroblastos 8b, factor de crecimiento de fibroblastos 8c, factor de crecimiento de fibroblastos 9, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor de factor neurotrófico derivado de la línea celular glial 1, receptor de factor neurotrófico derivado de la línea celular glial 2, proteína relacionada con el crecimiento, proteína relacionada con el crecimiento 2, proteína relacionada con el crecimiento 2, proteína relacionada con el crecimiento 3, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento similar a la insulina I, receptor de factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento similar a la insulina II, proteína de unión a factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor de factor inhibidor de leucemia 1, factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neurotrofina 3, neurotrofina 4, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento placentario 2, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de las plaquetas, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento derivado de las plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de las plaquetas AB, cadena B de factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento derivado de las plaquetas BB, receptor de factor de crecimiento derivado de las plaquetas 1, receptor de factor de crecimiento derivado de las plaquetas 2, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre, receptor de factor de células madre, factor de crecimiento transformante 1, factor de crecimiento transformante 2, factor de crecimiento transformante 3, factor de crecimiento transformante 1.2, factor de crecimiento transformante 4, factor de crecimiento transformante 5, factor de crecimiento transformante latente 1, proteína de unión a factor de crecimiento transformante I, proteína de unión a factor de crecimiento transformante II, proteína de unión a factor de crecimiento transformante III, receptor de factor de necrosis tumoral tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral tipo II, receptor del activador de plasminógeno de tipo urocinasa, factor de crecimiento endotelial vascular y proteínas quiméricas y fragmentos biológica o inmunológicamente activos de los mismos.

También puede lograrse terapia de combinación con un agente de unión específica de la presente invención, un anticuerpo, en combinación con un inductor apoptótico tal como un agente de unión específica (por ejemplo, un anticuerpo agonista o ligando TRAIL) que induce apoptosis mediante el receptor DR4 (TRAIL R-1) y/o el DR5 (TRAIL R-2). Se proporcionan ejemplos de tales agentes de unión específica en el documento WO 2007/027713, que da a conocer anticuerpos agonistas que inducen la apoptosis mediante el receptor DR5.

#### Inmunoterapia

La inmunoterapia se basa generalmente en el uso de moléculas y células efectoras inmunitarias para seleccionar

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

Según la presente invención, pueden seleccionarse como diana formas mutantes de Ang-1 y/o Ang-2 mediante inmunoterapia mediante o bien anticuerpos o bien conjugados de anticuerpos de la invención. Se contempla particularmente que las composiciones de anticuerpo de la invención pueden usarse en un enfoque de terapia combinada junto con terapia dirigida a Ang-2.

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

Se pretende que los siguientes ejemplos sirvan sólo para fines de ilustración y no debe interpretarse que limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

#### Ejemplo 1

##### Generación de anticuerpos madurados por afinidad contra Ang2 mediante presentación en fago

###### Estrategia global

Se empleó una aleatorización de CDR para potenciar la actividad de anticuerpo frente a Ang2, de manera similar a enfoques anteriores (Chen Y *et al.*, 1999 J Mol Biol (293)865-881; Yelton DE *et al.*, 1995 J Immunol (155) 1994-2004; Yang W-P *et al.*, 1995 J Mol Biol (254) 392-403). En resumen, se clonaron las regiones variables de anticuerpo 536 frente a Ang2 en el vector pCES-1 modificado por TargetQuest (Dyax Corp, de Haard HJ *et al* 1999 J Biol Chem (274) 18218-30). Se seleccionaron todas las regiones CDR como diana para la aleatorización de cada residuo de CDR mediante mutagénesis usando oligonucleótidos que contenían NNK. Tras la reacción de mutagénesis, se analizaron clones de fagos para determinar cada posición usando ELISA de fagos para identificar mutaciones beneficiosas (para los métodos, véanse los documentos WO 2004/046306, WO 2003/03057134 y US 2003/0099647 A1, para referencias de anticuerpos de fagos generales, Marks JD *et al.*, 1991 J Mol Biol (222) 581-597; Hoogenboom HR *et al* 1992 J Mol Biol (227) 381-388; Griffiths AD *et al.*, 1993 EMBO J (12) 725-734; Vaughan TP *et al.*, 1996 Nat Biotechnol (14) 309-314). Se convirtieron los clones con mutaciones beneficiosas en anticuerpos completos. Se emparejaron clones de cadena pesada con clones de cadena ligera y se sometió a prueba la IgG resultante para determinar la actividad de neutralización. Se caracterizaron adicionalmente los 22 mejores clones.

###### A. Construcción de molde de Fab de Ab536

Se clonaron las regiones variables del anticuerpo 536 en el vector pCES-1 usando técnicas de biología molecular convencionales (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). Se generaron fragmentos de cadena ligera de longitud completa y variable de cadena pesada mediante PCR usando los siguientes oligonucleótidos:

Cadena pesada inversa: CCGCTGTGCCCCAGAGGTGC

Cadena pesada directa: tttttccatggccgaggtccagctggtgcagtc

Cadena ligera inversa: TTTTIGGCGCGCCTTATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCT

Cadena ligera directa: tttttgtgcactgacattgtgatgactcagctct

Se insertó la región variable de cadena pesada entre los sitios de restricción, NcoI y BstEII. Se insertó la cadena ligera de longitud completa entre los sitios de restricción, ApaI y AclI. Se usó el constructo resultante como molde para la aleatorización de CDR.

###### B. Mutaciones de CDR

Se maduró por afinidad anticuerpo 536 como Fab en vector pCES-1 mediante una mutagénesis dirigida al sitio, gradual, usando oligonucleótidos que llevaban codones NNK (N=ATCG; K=GT) para cada una de las posiciones de CDR. Se usó el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene n.º 200518-5) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para identificar fagos con unión potenciada a Ang2, se realizó ELISA de fagos con proteína Ang2 humana biotinilada recubierta a 2 ug/ml en PBS sobre las placas de 96 pocillos Maxisorp (NUNC). En resumen, tras bloquear con el 2% de leche en PBS, se incubaron cultivos de fagos durante la noche que se hicieron

crecer con fago auxiliar y se detectaron fagos unidos con anticuerpos anti-M13 conjugados con HRP (Farmacia). Se comparó la señal de luminiscencia con respecto a Fab de 536 original, y se seleccionaron clones con una señal superior para su análisis adicional.

C. Conversión en IgG de Fab de fagos

5 Tras el ELISA de fagos y el análisis de secuencias, se seleccionaron 95 clones cada uno de mutagénesis de cadena ligera y cadena pesada con unión potenciada contra Ang2 y se convirtieron en IgG. En resumen, se amplificaron las regiones variables de cada clon mediante PCR usando un par de cebadores. Las secuencias de cebador para LC fueron CTG CTG CTG TGG CTG AGA GGT GCG CGC TGT GAT ATT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC y AAA AAA CGT ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CC. Los cebadores para HC fueron  
 10 TTTTTTTTGC GCGCTGTGAGGTCCAGCTGGTGCAGTC y AAAAAAGGCACTAGAGACGGTGACCAGGGTTCC. Tras digerir con BssHII y BsiWI para LC, y BssHII y BsmBI para HC, se insertaron las regiones variables en vectores pcDNA3 que contenían la secuencia líder VK1 y la secuencia constante de Kappa humana e IgG1 humana usando técnicas de biología molecular convencionales. Se transformó cada mezcla de ligación en dos placas de 96 pocillos de células competentes XL10 gold (Stratagene) y se hizo crecer la mezcla de transformación durante la noche para la preparación de plásmidos al día siguiente. Se emparejaron los ADN resultantes con ADN de LC o HC de 536 original relativo y se transfectaron transitoriamente en células 293T en OPTI-MEM usando Fugene 6. Tras 7 días, se recogieron los medios de células transfectadas y se cuantificó la concentración de IgG mediante un ensayo de Lance usando anticuerpo anti-IgG humana (específico de Fc) marcado con europio y anticuerpo anti-IgG humana marcado con APC (Perkin Elmer).

20 D. Selección de clones de IgG

Se sometieron a prueba medios condicionados que contenían IgG en un ensayo de neutralización de HTRF para determinar su efecto inhibitor de la interacción de Tie-2 con o bien Ang1 o bien Ang2. A partir de la selección inicial, se escogieron 15 clones de LC y 11 clones de HC que mostraron actividad mejorada. Se prepararon los ADN de los clones seleccionados y se confirmaron mediante secuenciación. Después se transfectó la combinación de cada mutante de LC y de HC, junto con clon original 536, en dos placas de 96 pocillos sembradas con células 293T. Se recogieron medios condicionados y se analizaron para determinar la concentración de IgG y el efecto inhibitor en el ensayo de neutralización de Tie2. A partir de esta combinación, se seleccionaron para su análisis adicional 22 clones que contenían una única mutación en cada una de LC y HC.

E. Expresión y purificación de anticuerpos frente a Ang2 humana madurados por afinidad en células CHO

30 Las células CS-9 usadas para la transfección del/de los plásmido(s) de expresión de IgG anti-Ang2 son una línea de células CHO en suspensión libre de suero. Se derivaron mediante adaptación gradual de células CHO DXB-11 para crecer en medio libre de suero tal como se describe en Rasmussen *et al*, 1998 (Rasmussen, B., Davis, R., Thomas, J., Reddy, P. 1998. Isolation, characterization and recombinant protein expression in Veggie-CHO: A serum-free CHO host cell line. *Cytotechnology*. 28: 31-42). Las células DXB-11 son un mutante deficiente en DHFR derivado de  
 35 células CHO-K1. (Chasin y Urlaub, 1983; Urlaub y Chasin. 1980. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216-4220; Chasin L.A., Graf, L., Ellis, N., Lanzberg, M., Urlaub, G. 1982. Gene amplification in dihydro folate reductase deficient mutants. Schimke, R.T. (Ed.) *Gene amplification*; Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., págs. 161-166). CHO-K1 es una línea celular epitelioides originalmente aislada del ovario de hámster chino (Kao y Puck. Genetics of somatic mammalian cells. VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60: 1275-1281, 1968).

Para derivar la línea de células huésped CS-9, se hicieron crecer células DXB-11 en medios con reducción gradual de suero a lo largo de 100 pases para obtener células adaptadas a medio libre de suero denominadas SF-CHO (Rasmussen *et al*, 1998). Posteriormente se subclonaron las células SF-CHO mediante clonación en dilución limitante y se evaluaron los clones individuales. Se seleccionó el clon CS-9 como la línea de células huésped para la expresión de proteínas recombinantes y se depositaron en medio libre de suero. Se sometió la muestra depositada a prueba para determinar agentes inesperados y la esterilidad y se encontró que estaba libre de agentes virales, de micoplasmas y microbianos. La línea de células huésped, CS-9, es una línea de células CHO deficiente en DHFR auxotrófica para glicina, hipoxantina y timidina (GHT). Los plásmidos pDC323 y pDC324 codifican cada uno para una parte del ADNc de DHFR y los 2 plásmidos deben complementarse entre sí para expresar una molécula de DHFR funcional mediante asociación de los 2 fragmentos de DHFR *in vivo*.

Los veintidós anticuerpos siguientes consistían cada uno en dos cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras (kappa o lambda) tal como se indica en la siguiente tabla 2.

Tabla 2

Anticuerpo*	Cadena pesada de anticuerpo	Cadena ligera de anticuerpo
H6L7	H6 HC	L7 LC
H5L7	H5 HC	L7 LC

H4L13	H4 HC	L13 LC
H11L7	H11 HC	L7 LC
H10L7	H10 HC	L7 LC
H4L7	H4 HC	L7 LC
H5L6	H5 HC	L6 LC
H2L7	H2 HC	L7 LC
H5L8	H5 HC	L8 LC
H6L8	H6 HC	L8 LC
H3L7	H3 HC	L7 LC
H5L4	H5 HC	L4 LC
H4L12	H4 HC	L12 LC
H6L6	H6 HC	L6 LC
H4L2	H4 HC	L2 LC
H4L6	H4 HC	L6 LC
H4L4	H4 HC	L4 LC
H5L11	H5 HC	L11 LC
H5L1	H5 HC	L1 LC
H4L11	H4 HC	L11 LC
H5L12	H5 HC	L12 LC
H5L9	H5 HC	L9 LC

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

Las tablas 3 y 4 exponen las secuencias y SEQ ID NO de las cadenas pesada y ligera (kappa y lambda) de los 22 anticuerpos anti-Ang-1 y/o anti-Ang-2 convertidos a partir del fago en anticuerpos de IgG1 de longitud completa. Se predijeron las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos monoclonales usando la base de datos VBASE que usa la técnica descrita por Kabat *et al* en: Sequences of Proteins of Immunological Interest (publicación de NIH n.º 91-3242; U.S. Dept. Health and Human Services, 5ª ed.). Se alinearon regiones Fab con secuencias en la base de datos con la secuencia de línea germinal más próxima y después se compararon visualmente con tales secuencias. En la tabla 5 se exponen las CDR para cada región variable (cadena pesada o ligera), tanto residuos como secuencias.

Tabla 3

Regiones variables de cadena pesada

HC de anticuerpo	Secuencia
536HC (Ref)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDILTGYGYWGQGLTVTVSS
H2 (SEQ ID NO. 1)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIEYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDILTGYGYWGQGLTVTVSS
H3 (SEQ ID NO. 2)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIQYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDILTGYGYWGQGLTVTVSS
H4 (SEQ ID NO. 3)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDILTGYGYWGQGLTVTVSS
H6 (SEQ ID NO. 4)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDIYTG YGYWGQGLTVTVSS
H10 (SEQ ID NO. 5)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDILTGYGLWGQGLTVTVSS
H11 (SEQ ID NO. 6)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDILTGYGMWGQGLTVTVSS

H5P (SEQ ID NO. 7)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLLDYDIWTGYGYWGQGTLVTVSS
--------------------	---

Tabla 4

Regiones variables de cadena ligera

LC de anticuerpo	Secuencia
536 kappa (ref.)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHTWPPTFGQGTKLEIK
L1 (SEQ ID NO. 8)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSIQSLLSNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHTWPPTFGQGTKLEIK
L2 (SEQ ID NO. 9)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHTWPPTFGQGTKLEIK
L4 (SEQ ID NO. 10)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHSHGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHTWPPTFGQGTKLEIK
L6 (SEQ ID NO. 11)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHVGNYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHTWPPTFGQGTKLEIK
L7 (SEQ ID NO. 12)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNFLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHTWPPTFGQGTKLEIK
L8 (SEQ ID NO. 13)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNMLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHTWPPTFGQGTKLEIK
L9 (SEQ ID NO. 14)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYAGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHTWPPTFGQGTKLEIK
L11 (SEQ ID NO. 15)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSDRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHTWPPTFGQGTKLEIK
L12 (SEQ ID NO. 16)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQATHWPPTFGQGTKLEIK
L13 (SEQ ID NO. 17)	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQVTHWPPTFGQGTKLEIK

Tabla 5

5 Regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadenas pesadas (HC) y cadenas ligeras (LC) de anticuerpos frente a Ang-1 y/o Ang-2; residuos y secuencia

Anti-cuerpo	CDR1		CDR2		CDR3	
	Resi-duos	Secuencia	Resi-duos	Secuencia	Resi-duos	Secuencia
Ab 536 HC	31-35	SYGMH	50-66	YISSSGSTIYYADSVK	99-111	DLLDYDILTGYGY
Ab 536 LC	24-39	RSSQSLLSHNGYNYLD	55-61	LGSNRAS	94-102	MQGTHTWPPT

ES 2 660 381 T3

H6L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <del>Y</del> TGYGY (SEQ ID NO. 32)
H6L7 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>F</del> LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <del>W</del> TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L7 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>F</del> LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L13 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD <del>L</del> LTYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L13 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>Y</del> LD (SEQ ID NO. 20)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQ <del>V</del> THWPPT (SEQ ID NO. 36)
H11L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDILT <del>G</del> MGY (SEQ ID NO. 37)
H11L7 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>F</del> LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H10L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDILT <del>G</del> LY (SEQ ID NO. 38)
H10L7 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>F</del> LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD <del>L</del> LTYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L7 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>F</del> LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L6 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <del>W</del> TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L6 LC	24-39	RSSQSLHHS <del>V</del> GYNYLD (SEQ ID NO. 21)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H2L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTI <del>E</del> YADSVRG (SEQ ID NO. 28)	99-111	DLLDYDILTGYGY (SEQ ID NO.39)
H2L7 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>F</del> LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L8 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <del>W</del> TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L8 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>M</del> LD (SEQ ID NO. 22)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H6L8 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <del>Y</del> TGYGY (SEQ ID NO. 32)
H6L8 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>M</del> LD (SEQ ID NO. 22)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H3L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTI <del>Q</del> YADSVRG (SEQ ID NO. 29)	99-111	DLLDYDILTGYGY (SEQ ID NO.39)
H3L7 LC	24-39	RSSQSLHHSNGYIN <del>F</del> LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)

ES 2 660 381 T3

H5L4 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <u>W</u> TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L4 LC	24-39	RSSQSLLHS <u>H</u> GYNYLD (SEQ ID NO. 23)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L12 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD <u>L</u> LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L12 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQ <u>A</u> THWPPT (SEQ ID NO. 40)
H6L6 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <u>Y</u> TGYGY (SEQ ID NO. 32)
H6L6 LC	24-39	RSSQSLLHS <u>V</u> GYNYLD (SEQ ID NO. 21)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L12 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD <u>L</u> LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L12 LC	24-39	RSSQSLL <u>L</u> SNGYNYLD (SEQ ID NO. 24)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L6 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD <u>L</u> LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L6 LC	24-39	RSSQSLLHS <u>V</u> GYNYLD (SEQ ID NO. 21)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L4 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD <u>L</u> LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L4 LC	24-39	RSSQSLLHS <u>H</u> GYNYLD (SEQ ID NO. 23)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L11 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <u>W</u> TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L11 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	<u>L</u> GSDRAS (SEQ ID NO. 30)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L1 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <u>W</u> TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L1 LC	24-39	RS <u>I</u> QSLL <u>O</u> SNGYNYLD (SEQ ID NO. 25)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L11 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD <u>L</u> LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L11 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	<u>L</u> GSDRAS (SEQ ID NO. 30)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L12 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <u>W</u> TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L12 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQ <u>A</u> THWPPT (SEQ ID NO. 40)
H5L9 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVRG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI <u>W</u> TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L9 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	<u>A</u> GSNRAS (SEQ ID NO. 31)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)

## EJEMPLO 2

Ensayos moleculares para evaluar anticuerpos frente a Ang-2

5 Se desarrollaron ensayos moleculares (ELISA de afinidad, ELISA de neutralización y BIAcore) para evaluar la unión de anticuerpo directa a Ang-2 y miembros de la familia relacionados (por ejemplo, Ang-1) y el efecto de anticuerpos sobre la interacción Ang-2:Tie2. Estos ensayos *in vitro* y basados en células se describen de la siguiente manera.

A. ELISA de afinidad

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

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

B. ELISA de neutralización

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

C. BIAcore de afinidad

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

55 Se llevaron a cabo ensayos de unión fijando en primer lugar aproximadamente 100 Ru de cada anticuerpo anti-Ang-2 candidato a la proteína G inmovilizada, tras lo cual se inyectaron entonces diversas concentraciones (0 - 100 nM) de huAng-2 o mAng-2 sobre la superficie de anticuerpo unido a una velocidad de flujo de aproximadamente 50 ul/min. durante aproximadamente 3 minutos. Se determinó la cinética de unión de anticuerpo incluyendo  $k_a$

(constante de velocidad de asociación),  $k_d$  (constante de velocidad disociación) y  $K_D$  (constante de equilibrio de disociación) usando el programa informático BIA evaluation 3.1 (BIAcore, Inc.). Constantes de equilibrio de disociación inferiores indicaron una mayor afinidad del anticuerpo por Ang-2.

5 Se sometieron a prueba los veintidós anticuerpos y una IgG1 de control negativo (denominada RDB1) usando ELISA de afinidad y de neutralización (tal como se describió en el ejemplo 3 anterior) así como el ensayo de neutralización de BIAcore para determinar sus capacidades de afinidad, neutralización y especificidad. Los resultados se exponen a continuación (tabla 2) y se calcularon usando procedimientos convencionales. Se evaluaron tres anticuerpos, H6L7, H4L4 y H4L11 para determinar concentraciones neutralizantes CI50 contra Ang-1 y Ang-2 humana y murina, usando el análisis mediante ELISA descrito anteriormente. Se mostró que los tres anticuerpos tenían reacción cruzada con Ang1 y Ang2 de ratón, conejo y macaco cangrejero, mostrando potencias similares a lo largo de ortólogos de angiopoyetina. Los resultados se notifican en la siguiente tabla 3.

D. CI50 y CI90 de anticuerpos frente a hAng-1 y hAng-2 mediante HTRF

15 Se mezcló un volumen igual de estreptavidina-europio (SA-EU) 1,6 nM y angiopoyetina 2 biotinilada 8 nM (interna) o angiopoyetina 1 biotinilada (R&D N.º de catálogo BAF923) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad con rotación en un tubo cónico de 15 ml (Fisher 352096). Después se añadieron 50 ul de la mezcla de SA-EU/Ang 2(1) biotinilada anterior a cada pocillo en una placa de mezclado (Costar 3356). A la placa de mezclado se le añadieron 50 ul de anticuerpo frente a Ang1 y Ang2 diluido en serie a 4x concentraciones finales a cada pocillo. Entonces se incubó la placa de mezclado a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador en la oscuridad. En una placa de ensayo (Costar 3356), se añadieron 20 ul de huTie-2-Fc-APC 10 nM (Prozyme Custom n.º de lote DF99-048) a cada pocillo. Después se transfirieron 20 ul de la mezcla de cada pocillo en la placa de mezclado a cada pocillo en la placa de ensayo. Se incubó la placa de ensayo a temperatura ambiente durante 20 horas en la oscuridad con rotación. Después se leyó la placa de ensayo en un lector de placas RUBY star (BMG labtechnologies, INC). Todos los reactivos en el ensayo se diluyeron con tampón de HTRF (Tris HCl 50 mM, NaCl 100 mM, el 0,1% de BSA y el 0,05% de Tween 20). Se calcularon la CI50 y la CI90 con GRAFIT 5.0.

25

Tabla 6

Potencia bioquímica de anticuerpos contra hAng1 y hAng2

Anticuerpo	CI50 hAng1	CI90 hAng1	CI90/CI50	CI50 hAng2	CI90 hAng2	CI90/CI50
H6L7	0,06	0,49	8,0	0,06	0,19	3,3
H5L7	0,07	0,42	6,3	0,07	0,23	3,6
H4L13	0,15	1,6	11	0,06	0,19	3,2
H11L7	0,15	1,2	8,1	0,06	0,20	3,2
H10L7	0,15	2,2	14	0,06	0,19	3,4
H4L7	0,23	2,8	12	0,06	0,22	3,5
H5L6	0,32	3,6	11	0,07	0,23	3,4
H2L7	0,33	3,6	11	0,06	0,20	3,3
H5L8	0,37	3,6	10	0,07	0,21	3,1
H6L8	0,57	7,7	13	0,05	0,19	3,6
H3L7	0,58	7,1	12	0,06	0,23	4,0
H5L4	0,60	11	19	0,07	0,21	2,8
H4L12	0,63	8,7	14	0,06	0,21	3,4
H6L6	0,66	10	16	0,06	0,20	3,4
H4L2	0,66	6,8	10	0,06	0,19	3,1
H4L6	0,74	15	20	0,06	0,20	3,2
H4L4	0,87	8,2	9,4	0,06	0,16	2,7
H5L11	0,97	18	18	0,08	0,25	3,3
H5L1	1,7	24	15	0,06	0,29	4,4
AMG 386*	2,6	106	41	0,03	0,13	4,1
AMG 386*	3,9	278	71	0,03	0,15	4,4
H4L11	7,3	107	15	0,05	0,17	3,4
H5L12	14	159	11	0,07	0,31	4,4
H5L9	18	181	10	0,19	1,57	8,5

\* Peptícuerpo.

EJEMPLO 3:

Caracterización molecular de anticuerpos frente a angiopoyetina

30 Se seleccionaron para estudios adicionales cuatro de los anticuerpos de IgG2 completamente humana (Ab536, H4L4, H6L7 y H4L11) con potente actividad inhibidora de hAng2 y una gama de actividades inhibidoras de hAng1. Se mostró que los 4 anticuerpos tenían reacción cruzada con Ang1 y Ang2 de ratón, conejo y macaco cangrejero, mostrando potencias similares a lo largo de ortólogos de angiopoyetina (tablas 7 y 8).

Tabla 7

Potencia bioquímica de anticuerpos frente a angiopoyetina contra ortólogos de Ang2

Clon	CI50 de humana (nM)	Ang2 cyno (nM)	Ang2 de murina (nM)	Ang2 de conejo (nM)
H6L7	0,22	0,19	0,13	0,15
H4L4	0,22	0,24	0,15	0,15
AMG 386	0,12	0,17	0,10	0,10
H4L11	0,21	0,16	0,12	0,12
536LC1	0,27	0,19	0,14	0,20

ELISA que mide la neutralización de la interacción ligando / receptor.

Tabla 8

Potencia bioquímica de anticuerpos frente a angiopoyetina contra ortólogos de Ang1

Clon	CI50 de humana (nM)	Ang1 cyno (nM)	Ang1 de murina (nM)	Ang1 de conejo (nM)
H6L7	0,12	0,19	0,12	0,18
H4L4	3,2	4,0	3,3	2,8
AMG 386	1,2	2,9	2,7	4,3
H4L11	17	14	7,7	16
536LC1	515	531	305	502

ELISA que mide la neutralización de la interacción ligando / receptor.

EJEMPLO 4:

Actividad de anticuerpos frente a angiopoyetina en xenoinjertos de tumor Colo205

Se evaluaron tres anticuerpos (H6L7, H4L4 y H4L11) en el modelo de xenoinjerto de carcinoma colorrectal humano Colo205. Para cada grupo de estudio, se inyectaron a ratones por vía subcutánea en el costado derecho  $2 \times 10^6$  células en Matrigel™. Se asignaron aleatoriamente diez animales con un volumen tumoral promedio de  $300 \text{ mm}^3$  a cada grupo experimental. A los animales se les inyectaron i.p. dos veces por semana, comenzando en el día 17 tras la implantación,  $300 \mu\text{g}$  de los anticuerpos dirigidos hacia angiopoyetina o anticuerpo control de isotipo. En este modelo se incluyó AMG 386 a la dosis biológica óptima (OBD) de  $14 \mu\text{g}$  (s.c.) dos veces por semana como control positivo y se incluyó anticuerpo 536LC1 a  $300 \mu\text{g}$  dos veces por semana. Se midieron el peso corporal y el tamaño tumoral dos veces por semana.

Tal como se muestra en la figura 1, los tres anticuerpos inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con tratamiento con un anticuerpo control de isotipo ( $p < 0,0001$ ). El tratamiento con H6L7 y H4L4 dio como resultado una inhibición significativamente mayor del crecimiento tumoral en comparación con 536LC1. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Al final del experimento, se recogieron tumores, se fijaron en zinc-formalina y se incrustaron en parafina. Se tiñeron secciones histológicas de tumor con hematoxilina. Entonces se estimuló la fracción tumoral viable, usando determinación de umbral de RGB y recuento de píxeles automatizado, a partir de una imagen digital 1x de la sección transversal del tumor completa. Se calculó la carga tumoral viable como la fracción viable multiplicada por el peso tumoral terminal. Los datos representan la media  $\pm$  EEM (n=10). La figura 2 demuestra que los anticuerpos H6L7, H4L7 y H4L11 también redujeron significativamente la carga tumoral con respecto al control ( $p < 0,0001$ ), lo que sugiere que las mediciones de tumor basadas en volumen subestimaron el efecto antitumoral de los anticuerpos.

Se realizó histopatología con tumores y tejidos normales de los ratones en el estudio mostrado en las figuras 1 y 2. El tratamiento de ratones desnudos que llevaban xenoinjerto con los inhibidores de angiopoyetina (AMG 386, 536LC1, H4L4, H4L11 o H6L7) no provocó efectos anatómicos adversos en tejidos no diana.

EJEMPLO 5

Efecto de anticuerpos anti-Ang-1 y/o Ang-2 sobre la proliferación de células endoteliales

En un experimento paralelo, se trataron animales con tumores de aproximadamente  $400 \text{ mm}^3$  con 536LC1 (también conocido como LC1), H4L11, H4L4, H6L7, AMG 386 o IgG2 de control durante 72 h. Diecisiete horas antes del sacrificio, se implantaron en animales minibombas osmóticas que contenían BrdU  $3 \text{ mg/ml}$ . Tras el sacrificio, se aislaron células endoteliales de los ratones que llevaban tumor Colo205 y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la proliferación. Se tiñeron células disociadas con anticuerpos anti-CD45 de ratón-FITC y anti-CD31 de ratón-PE, seguido por fijación y tinción con anticuerpos anti-BrdU-alexa647. Los datos representan la media  $\pm$  EEM (n = 5). Tal como se muestra en la figura 3, el tratamiento con todos los anticuerpos redujo significativamente el

porcentaje de células positivas para BrdU ( $p < 0,002$  en comparación con control de IgG2). Estos datos concuerdan con un mecanismo terapéutico anti-angiogénico mediante el cual los anticuerpos dirigidos a angiopoyetina inhiben la proliferación de células endoteliales tumorales *in vivo*.

EJEMPLO 6

5 Ajuste de la dosis de H4L4 en xenoinjertos de tumor Colo205

Se seleccionó el anticuerpo H4L4 para un análisis más extenso explorando la dependencia de la dosis de la inhibición del crecimiento tumoral mediada por H4L4. A los animales se les inyectó i.p. H4L4 dos veces por semana comenzando en el día 14 a dosis que oscilaban entre 3  $\mu\text{g}$  y 300  $\mu\text{g}$ . Se incluyó AMG 386 a la dosis biológica óptima de 14  $\mu\text{g}$  (s.c.) dos veces por semana como control positivo. Tal como se muestra en la figura 4, todas las dosis de H4L4 inhibieron significativamente el crecimiento tumoral y la carga tumoral viable ( $p < 0,0001$ ), con una OBD de ~30  $\mu\text{g}$  en el análisis de la carga tumoral viable (figura 5.).

EJEMPLO 7

Efecto de H4L4 sobre la proliferación de células endoteliales tumorales Colo205 *in vivo*

15 En un experimento paralelo, se trataron ratones que llevaban tumor Colo205 con tumores de aproximadamente 450  $\text{mm}^3$  con una dosis única de H4L4, AMG 386 o IgG2 de control durante 72 horas y después se analizaron como en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 6, el tratamiento con H4L4 inhibió significativamente la proliferación de células endoteliales de una manera dependiente de la dosis, con una OBD de 30  $\mu\text{g}$ .

EJEMPLO 8

Farmacocinética de H4L4, H6L7, H4L11 y 536LC1 en ratones, ratas y macaco cangrejero

20 Se ha caracterizado la farmacocinética (PK) de H4L4, H6L7, H4L11 y 536LC1 en ratones CD-1 tras la administración de una dosis única intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.). También se caracterizó la PK de H4L4 y H6L7 en ratas Sprague-Dawley y monos cynomolgus tras la administración de una dosis única i.v.

25 Tras la administración de una dosis única i.v. o i.p. a ratones, la exposición a H4L4 pareció aumentar de manera aproximadamente proporcional a la dosis en el intervalo de dosis de 0,1 a 10  $\text{mg/kg}$  (tabla 4). La semivida terminal media global ( $t_{1/2,z}$ ), el aclaramiento (CL) y el volumen de distribución en el estado estacionario ( $V_{ss}$ ) fueron de 207 h, 0,43  $\text{ml/h/kg}$  y 128  $\text{ml/kg}$ , respectivamente. La biodisponibilidad (% de F) tras la administración i.p. fue superior al 90% para todos los grupos de dosis. En cambio, H6L7, H4L11 y 536LC1 mostraron PK no lineal en ratones con una exposición que aumentaba más que de manera proporcional a la dosis desde 0,1 hasta 10  $\text{mg/kg}$ . La exposición a H6L7 en ratas y monos también aumentó más que de manera proporcional a la dosis tras una dosis única i.v. de 0,1 a 10  $\text{mg/kg}$ .

30 Al contrario que su perfil de PK lineal en ratones, H4L4 mostró PK no lineal en rata y mono. El tiempo de residencia medio (MRT) en ratas osciló entre 57 y 217 horas; el CL osciló entre 0,3 y 1,4  $\text{ml/h/kg}$ ; el  $V_{ss}$  osciló entre 57 y 68  $\text{ml/kg}$ . En monos, el MRT osciló entre 40 y 163 horas; el CL osciló entre 0,4 y 1,9  $\text{ml/h/kg}$ ; el  $V_{ss}$  osciló entre 49 y 75  $\text{ml/kg}$ .

35 También se evaluó la PK de H4L4 en ratones desnudos que llevaban xenoinjertos de tumor Colo205 en un estudio farmacológico a una dosis de 3, 10, 30, 100 ó 300  $\mu\text{g/ratón}$ , administrada i.p. dos veces por semana durante 4 semanas. La exposición a H4L4 en suero aumentó de manera aproximadamente proporcional a la dosis según se evaluó mediante concentraciones valle en suero. La PK de H4L4 en ratones desnudos fue similar a la observada en ratones CD-1 y la PK no pareció cambiar a lo largo del tiempo.

40 Tabla 9

Parámetros de PK de H4L4 y H6L7 en especies preclínicas

Dosis de H4L4 (mg/kg)	Ratón			Rata			Mono		
	0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10
$t_{1/2,z}$ (h)	196	180	244	42,5	66,7	213	36,2	35,6	80,1
MRT (h)	259	273	420	57,4	107	217	40,1	52,0	163
CL (ml/h/kg)	0,666	0,386	0,249	1,39	0,552	0,319	1,89	0,933	0,414
$V_{ss}$ (ml/kg)	173	105	105	66,4	57,0	68,5	74,9	48,6	67,4
$V_0$ (ml/kg)	71,0	46,6	46,7	43,3	34,5	36,1	48,2	40,8	44,0

Dosis de H6L7 (mg/kg)	Ratón			Rata			Mono		
	0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10
$t_{1/2,z}$ (h)	8,27	99,0	82,8	9,43	25,8	92,9	10,4	32,6	65,0
MRT (h)	11,6	54,3	263	13,2	41,2	158	15,1	51,8	158

CL (ml/h/kg)	19,4	2,00	0,349	3,31	1,02	0,331	2,81	0,824	0,358
V <sub>ss</sub> (ml/kg)	224	109	91,8	43,3	41,3	51,9	41,3	42,2	55,2
V <sub>0</sub> (ml/kg)	90,9	58,4	56,6	35,4	35,3	38,1	40,0	37,7	43,1

## EJEMPLO 9

La neutralización de angiopoyetina-1 media en la supresión dependiente de contexto de la angiogénesis y el crecimiento tumoral

5 Aunque la angiopoyetina-2 (Ang2) es un mediador clave de la angiogénesis posnatal, el papel de la angiopoyetina-1 (Ang1) en este entorno está menos claro. Para investigar la función posnatal de Ang1, se han desarrollado peptidocuerpos potentes y selectivos (proteínas de fusión péptido-Fc) que inhiben la interacción entre Ang1 y su receptor, Tie2. Se muestra que el antagonismo de Ang1 selectivo no tiene ningún efecto independiente en modelos de enfermedades asociadas con angiogénesis (cáncer y retinopatía diabética), aunque puede inducir atrofia de ovarios en ratas juveniles normales e inhibir la angiogénesis folicular de ovarios en un modelo de ovulación inducida por hormonas. Sorprendentemente, la actividad de inhibidores de Ang1 parece desenmascarse en algunos modelos de enfermedad cuando se combinan con inhibidores de Ang2. La inhibición doble de Ang1 y Ang2 suprime de manera cooperativa la angiogénesis folicular de ovarios y el crecimiento de xenoinjertos de tumores; sin embargo, la inhibición de Ang1 no logra aumentar la actividad de inhibición de Ang2 en la supresión de la proliferación de células endoteliales tumorales, angiogénesis corneal y angiogénesis retiniana inducida por oxígeno. En ningún caso se mostró que la inhibición de Ang1 1) confiera actividad superior a la de la inhibición de Ang2 o 15 inhibición doble de Ang1/Ang2 o 2) antagonice los efectos de la inhibición de Ang2. Estos resultados implican que Ang1 desempeña un papel dependiente de contexto en promover la angiogénesis posnatal y la patología asociada con la angiogénesis.

20 Ang1 desempeña un papel importante en la angiogénesis en el desarrollo, pero su función en la neovascularización posnatal está menos clara. Se ha mostrado que Ang1 media en efectos tanto pro como anti-angiogénicos en diversos entornos posnatales. Para investigar la función de Ang1 inhibiendo Ang1 endógena. Para ello, se han desarrollado peptidocuerpos neutralizantes de Ang1 y se sometieron a prueba solos o en combinación con inhibidores de Ang2 en modelos preclínicos de angiogénesis posnatal.

25 Se generaron peptidocuerpos neutralizantes de Ang1 para investigar el papel de Ang1 en la angiogénesis. Se cribaron bibliotecas de péptidos de presentación en fago para identificar péptidos que se unen a Ang1, pero no a Ang2. Se convirtieron los clones resultantes en peptidocuerpos expresando los péptidos en *E. coli* como fusiones con la parte Fc de IgG1 humana. Entonces se examinaron peptidocuerpos mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y ensayos de fluorescencia de resolución temporal homogénea (HTRF) para determinar su capacidad para neutralizar la interacción entre Tie2 y angiopoyetinas. Se maduró mediante afinidad uno de esos anticuerpos para aumentar su capacidad para antagonizar Ang1, y se eligió un peptidocuerpo resultante, mL4-3, para los estudios en el presente documento. mL4-3 mostró una potencia similar contra varios ortólogos de Ang1, y presentó una selectividad de >40.000 veces con respecto a Ang2 (tablas 10 y 11). En la tabla 10 también se muestran dos peptidocuerpos anteriormente descritos: AMG 386 [también conocido como 2xCon4 (C)] y L1-7(N). L1-7(N) es un inhibidor de Ang2 muy potente y selectivo, y AMG 386 es un inhibidor doble de Ang1 y Ang2. Los perfiles farmacocinéticos de mL4-3 en roedores fueron aceptables para una dosificación s.c. de diaria a semanal (tabla 3). 35

mL4-3 puede usarse como reactivo para analizar la función de Ang1 *in vivo*. Para evaluar si mL4-3 podía secuestrar selectivamente Ang1 *in vivo*, se administraron mL4-3, L1-7(N) y Fc s.c. a ratones, seguido por una exposición i.v. con Ang1 recombinante. Ang1 indujo la fosforilación de Tie2 en endotelio pulmonar de ratón (aproximadamente 5 veces), un efecto que pudo prevenirse mediante mL4-3, pero no mediante L1-7(N) o Fc (figura 7).

40 A continuación, se deseaba determinar si mL4-3 podía neutralizar Ang1 endógena en un entorno en el que se sabía que Ang1 desempeñaba un papel fisiológicamente relevante. Estudios de deficiencia genética en el desarrollo han mostrado que la delección de Ang1 reduce el tamaño cardíaco y el plegamiento endocárdico en embriones. En un intento por repetir este fenotipo farmacológicamente, se administró mL4-3 a ratones preñados al inicio y a la mitad de la gestación. Se recogieron los embriones en el día embrionario 12,5, momento en el cual se observó mortalidad en embriones de ratón carentes de Ang1. La evaluación farmacocinética de lisados de embriones de ratón demostró un nivel valle medio de mL4-3 de 3,0 µg/g de tejido, confirmando que mL4-3 podía cruzar la placenta. El análisis histológico reveló trabeculación y tamaño cardíaco reducidos, similar a, pero menos drástico que, lo observado en embriones carentes de Ang1 (figura 8). El fenotipo menos pronunciado de los embriones tratados con mL4-3 puede ser una consecuencia de exposiciones embrionarias a mL4-3 inferiores a la óptima y un secuestro de Ang1 incompleto. No obstante, mL4-3 induce claramente defectos cardíacos embrionarios que son una fenocopia de los de ratones con deficiencia genética de Ang1, confirmando la utilidad de mL4-3 como reactivo para investigar la función de Ang1 *in vivo*. 45 50

55 El antagonismo de Ang1 aumenta el antagonismo de Ang2 en la supresión del crecimiento tumoral. En un informe anterior, se demostró que L1-7(N) y AMG 386 administrados sistémicamente podían inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumor Colo205 implantados en ratones desnudos. En ese estudio, los efectos antitumorales de AMG 386 fueron moderadamente superiores a los de L1-7(N) (P = 0,006). Para confirmar que la inhibición doble de

Ang1/Ang2 confiere una mejor supresión del crecimiento tumoral que la inhibición de Ang2 sola, se realizó un experimento similar, pero esta vez también se sometieron a prueba grupos tratados con mL4-3 o una combinación de mL4-3 y L1-7(N) (figura 9). El grupo de tratamiento con AMG 386 y el grupo de tratamiento con combinación mL4-3/L1-7(N) mostraron una eficacia antitumoral comparable; además, ambos grupos mostraron una eficacia superior a la mediada por o bien L1-7(N) o bien mL4-3 solos. De hecho, mL4-3 no tenía ningún efecto de agente individual distinguible sobre el crecimiento tumoral, lo que implica que la combinación del antagonismo de Ang2 con el antagonismo de Ang1 puede haber desmascarado el efecto antitumoral de la inhibición de Ang1. Repeticiones adicionales de estos experimentos confirmaron que AMG 386 y la combinación de mL4-3/L1-7(N) mediaban una mayor supresión del crecimiento tumoral que L1-7(N) solo (datos no mostrados). Sin embargo, en una minoría de casos, estas diferencias no alcanzaron significación estadística, lo que quizás refleja la sutil naturaleza de la ventaja incremental conferida por la inhibición doble de Ang1/Ang2 con respecto a la inhibición selectiva de Ang2. La inhibición selectiva de Ang1 no tenía ningún efecto antitumoral por sí misma en ninguno de los experimentos en los que se sometió a prueba (figura 9 y datos no mostrados).

El antagonismo de Ang2, pero no el antagonismo de Ang1, inhibe la proliferación de células endoteliales tumorales, la angiogénesis corneal y la angiogénesis retiniana. Anteriormente se mostró que la inhibición doble de Ang1/Ang2 podía suprimir la proliferación de células endoteliales tumorales Colo205 *in vivo*. Para investigar si este efecto se confería mediante inhibición de Ang1, inhibición de Ang2 o una combinación de las dos, se trataron ratones que llevaban tumor Colo205 con mL4-3, L1-7(N), mL4-3/L1-7(N) o AMG 386. Como con la lectura del volumen tumoral descrita en la sección anterior, mL4-3 no tenía ningún efecto de agente individual sobre la proliferación de células endoteliales tumorales, mientras que L1-7(N) era inhibidor (figura 10A). Sin embargo, resulta curioso que la inhibición doble de Ang1/Ang2 no confirió un efecto sobre la proliferación de células endoteliales mayor que la inhibición de Ang2 sola (figura 10A), una observación que se ha producido repetidamente (datos no mostrados) y supone un contraste con los aparentes efectos cooperativos de la inhibición combinada de Ang1/Ang2 sobre el crecimiento de tumor Colo205. Esta diferencia implica que la represión de la proliferación de células endoteliales sólo es un componente que subyace a la inhibición del crecimiento tumoral mediada por el antagonismo de angiopoyetina.

A continuación se sometieron a prueba estos agentes en dos modelos de angiogénesis ocular, uno que implicaba la córnea y otro que implicaba la retina. La córnea es normalmente avascular, pero puede producirse angiogénesis patológica en la córnea como efecto secundario a estados tales como queratitis y rechazo de trasplante de córnea. Se usaron modelos inducidos por VEGF y por factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) de angiogénesis corneal para someter a prueba los papeles del antagonismo de Ang1 y de Ang2 en la formación de nuevos vasos. Tal como se observó con la proliferación de células endoteliales, la angiogénesis corneal parecía ser dependiente de Ang2, pero no de Ang1 (figuras 10B y 10C). Puede extraerse la misma conclusión de la evaluación de estos peptidocuerpos antagonizantes de la angiopoyetina en un modelo de retina dependiente de Tie2 de angiogénesis en el que se indujo la neovascularización mediante cambios en la tensión de oxígeno ambiental (figura 10D). Por tanto, en tres entornos preclínicos (proliferación de células endoteliales, angiogénesis corneal y angiogénesis retiniana), la inhibición de Ang2 suprimió drásticamente la formación de nuevos vasos, mientras que la inhibición de Ang1 no tuvo ningún efecto sola o en combinación con la inhibición de Ang2.

La inhibición selectiva de Ang1 o Ang2 induce atrofia de ovarios, pero no espesamiento de la placa epifisaria. Para evaluar los efectos de la inhibición de angiopoyetina en animales normales, se trataron ratas sistémicamente con mL4-3, L1-7(N) o AMG 386 durante un mes. Se ha observado que AMG 386, como los antagonistas de VEGF, induce espesamiento de la placa epifisaria y atrofia de ovarios, efectos que se considera que son consecuencias basadas en el mecanismo de la terapia antiangiogénica. En el presente estudio, AMG 386 provocó espesamiento de la placa epifisaria en todos los animales tratados, mientras que, de manera notable, L1-7(N) y mL4-3 no lograron alterar la morfología epifisaria en ninguna rata (tabla 13). Por tanto, la inducción del espesamiento de la placa epifisaria parece requerir la inhibición de tanto Ang1 como Ang2. En sorprendente contraste, los tres peptidocuerpos produjeron atrofia de ovarios a tasas de incidencia similares, lo que indica que la inhibición selectiva de Ang1 o Ang2 es suficiente para inducir atrofia de ovarios.

Los inhibidores de Ang1 y Ang2 suprimen de manera cooperativa la angiogénesis folicular de ovarios. Para entender mejor los efectos de la inhibición de angiopoyetina sobre el ovario, se empleó un modelo inducido por hormonas de angiogénesis folicular de ovarios que permitió una evaluación controlada de la neovascularización en ratones que nunca habían ovulado anteriormente. En este modelo, se usaron suero de yegua preñada (PMS) y gonadotropina coriónica humana (HCG) para inducir ovulación rápida, sincronizada en múltiples folículos (figura 11). Se trataron ratones sistémicamente con control de Fc, mL4-3, L1-7(N) o una combinación de mL4-3/L1-7(N) para determinar los efectos de estos agentes sobre la formación de nuevos vasos en la transformación de folículos de Graaf. Se realizaron dos repeticiones diseñadas de manera idéntica de este experimento en diferentes días y, notablemente, ambos proporcionaron perfiles de actividad casi idénticos con respecto al porcentaje de inhibición del área de vasos sanguíneos (repetición 1, repetición 2): L1-7(N) (8%, 11%), mL4-3 (15%, 14%), mL4-3/L1-7(N) (24%, 26%). Todos los grupos de agente individual y peptidocuerpos en combinación, con la excepción del grupo de L1-7(N) en el experimento 1, mediaron inhibición de angiogénesis estadísticamente significativa con respecto al grupo de Fc ( $P < 0,05$ ) (figura 11). Por tanto, pudieron provocarse tanto la inhibición de la angiogénesis de ovarios como la inducción de atrofia de ovarios mediante la inhibición de Ang1, Ang2, o ambos, lo que concuerda con la noción de que la atrofia de ovarios observada era una consecuencia de no lograr el desarrollo de nuevos vasos.

- Se demostró que la inhibición de Ang1 desempeña un papel dependiente del contexto en la supresión de la angiogénesis en modelos de enfermedad preclínicos y en animales normales. En el útero, la inhibición de Ang1 farmacológica fue una fenocopia parcial de la ablación genética de Ang1, lo que concuerda con el importante papel de Ang1 en la angiogénesis en el desarrollo. Tras el nacimiento, el antagonismo selectivo de Ang1 inhibió la angiogénesis de ovarios e indujo atrofia de ovarios, efectos que también podían lograrse inhibiendo Ang2 solo o Ang1 más Ang2 en conjunto. Sin embargo, en modelos de enfermedad posnatal, la inhibición de Ang1 tuvo poco efecto por sí sola, aunque su actividad biológica pareció desenmascarse en algunos entornos cuando se combinó con la supresión de Ang2. Sigue teniendo que determinarse el mecanismo que subyace a la dependencia diferencial de Ang1 en estos entornos.
- El ovario, gracias a su papel en el ciclo reproductor, es uno de los pocos órganos que experimenta angiogénesis normal en adultos. Basándose en los patrones de expresión en el ovario de Ang1 y Ang2 en ratas con ovulación inducida por hormonas, se ha propuesto que Ang2 desempeña un papel temprano en la invasión de vasos, y Ang1 desempeña un papel tardío para madurar los vasos recién formados. Con esta hipótesis, Ang2 y Ang1 realizan funciones opuestas, en las que Ang2 desplaza inicialmente a Ang1 de Tie2, dando como resultado la desestabilización de vasos y la angiogénesis. Posteriormente se invierte este estado de plasticidad cuando Ang1 expulsa a Ang2 del receptor para volver a establecer la quiescencia y estabilidad vasculares. En conflicto con este modelo, los datos del actual estudio implican que tanto Ang1 como Ang2 desempeñan papeles proangiogénicos en el ovario.
- En el modelo de xenoinjerto de tumor Colo205, el antagonismo de Ang1 y Ang2 medió una mayor supresión tumoral que la que se logró inhibiendo Ang1 o Ang2 individualmente, lo que indica que este modelo depende de ambas angiopoyetinas. Sin embargo, en el mismo modelo, sólo la inhibición de Ang2 pudo modular por disminución la proliferación de células endoteliales tumorales, lo que sugiere que Ang1 no está implicada en esta función. ¿Qué explica las diferentes dependencias de estos dos criterios de valoración de Ang1? Una posibilidad es que la inhibición de Ang1 tiene un efecto directo sobre las células tumorales. Sin embargo, esto parece poco probable dado que AMG 386, un inhibidor doble de Ang1 y Ang2, no tiene ningún efecto sobre el crecimiento *in vitro* de células tumorales Colo205 cultivadas. Una segunda posibilidad es que el antagonismo de Ang1 desempeña un papel anti-angiogénico que no se confiere mediante la inhibición de proliferación de células endoteliales, sino en su lugar mediante mecanismos que pueden tener un impacto sobre funciones tales como migración o invasión de células endoteliales. Esta explicación podría ser aplicable si Ang1 y Ang2 mediaran señales cualitativa o cuantitativamente diferentes a través de Tie2, o si Ang1 enviara señales a través de receptores adicionales que no fueran sensibles a Ang2. Una tercera posibilidad es que Ang1 envía señales a través de Tie2 en células no endoteliales, tales como monocitos que expresan Tie2 (TEM). Los TEM se reclutan en tumores, en los que se agrupan alrededor de nuevos vasos. La ablación selectiva de TEM en ratones que llevan tumores suprime la angiogénesis tumoral e inhibe el crecimiento tumoral, y se ha postulado que los TEM promueven la angiogénesis tumoral proporcionando señales paracrinas que estimulan nuevos vasos. Quizás Ang1 estimula los TEM para liberar citocinas proangiogénicas distintas de las angiopoyetinas. En un entorno de este tipo, la inhibición de Ang 1 puede tener un efecto anti-neovascular indirecto que puede complementar al efecto anti-angiogénico directo de la supresión de Ang2.
- Al contrario que los efectos sutiles y dependientes de contexto de la inhibición de Ang1, la inhibición de Ang2 medió frecuentemente efectos que eran equivalentes o casi equivalentes a los conferidos mediante el antagonismo combinado de Ang1 y Ang2, lo que implica que Ang2 puede ser la angiopoyetina dominante implicada en la angiogénesis posnatal. Ang1 parece ser la angiopoyetina dominante implicada en la angiogénesis prenatal, lo que sugiere un desplazamiento de la dependencia de estos dos factores alrededor del momento del parto. Los presentes inhibidores no antagonizan Ang4, pero la relevancia funcional de este factor no queda clara, dado su patrón de expresión limitado al pulmón.
- Se ha mostrado que Ang1 y Ang2 desempeñan papeles funcionales tanto similares como opuestos en diversos sistemas *in vitro* e *in vivo*. La incapacidad de extraer conclusiones sistemáticas con respecto a esto a lo largo de múltiples publicaciones puede ser en parte consecuencia de las diferentes condiciones en las que se examinó la cuestión. Estas diferencias incluyen la evaluación de 1) sistemas *in vitro* frente a *in vivo*, 2) angiogénesis prenatal frente a posnatal, 3) lechos vasculares variables, 4) angiogénesis patológica frente a normal y 5) diseños experimentales de ganancia de función frente a pérdida de función. Esta diferencia final puede ser particularmente importante, ya que la adición de factores exógenos a un sistema de modelo puede ser un medio fisiológicamente menos relevante para esclarecer la función que la eliminación de factores endógenos. Quizás los experimentos publicados más informativos con respecto a esto son aquellos en los que Ang1 y Ang2 se han deletado genéticamente en la línea germinal de roedores. Estos estudios proporcionan conocimientos significativos sobre los papeles en el desarrollo de Ang1 y Ang2. Sin embargo, es más difícil examinar genéticamente la función *in vivo* posnatal de Ang1 y Ang2 sin la disponibilidad de sistemas deficientes condicionales; el ratón deficiente en Ang1 constitutivo muere en el útero (como lo hace el deficiente en Ang2 constitutivo en algunos contextos genéticos de cepas), y el fenotipo posnatal de ratones deficientes en Ang2 supervivientes puede verse influido por efectos residuales de la delección de genes en el desarrollo. Usando inhibidores de Ang1 y Ang2 farmacológicos para examinar los papeles posnatales de Ang1 y Ang2 *in vivo*, se han evitado estos problemas. Los resultados del actual estudio implican que Ang1 y Ang2 no se oponen funcionalmente uno a otro en sistemas posnatales, y en algunos casos, parecen actuar cooperativamente.

La angiogénesis patológica está asociada con niveles de angiopoyetina alterados en varias enfermedades, incluyendo cáncer, retinopatía diabética, degeneración macular, artritis reumatoide, osteoartritis y psoriasis. Las intervenciones dirigidas a angiopoyetina en estas indicaciones terapéuticas pueden proporcionar beneficio clínico. Los datos presentados en el presente documento sugieren que, en algunos entornos, la inhibición combinada de Ang1 y Ang2 puede proporcionar una eficacia terapéutica superior a la mediada seleccionando como diana Ang2 sola.

#### Métodos

*Selección mediante presentación en fago de péptidos de unión a Ang1.* Se usaron tres bibliotecas de fagos filamentosos, TN8-IX ( $5 \times 10^9$  transformantes independientes), TN12-I ( $1,4 \times 10^9$  transformantes independientes) y Linear ( $2,3 \times 10^9$  transformantes independientes) (Dyax Corp., Cambridge, MA) para seleccionar fagos de unión a Ang1. Tras la selección negativa con perlas Dynabeads de estreptavidina vacías (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) bloqueadas con el 2% de albúmina sérica bovina (BSA) o perlas cargadas con Ang2 biotinilada (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), se incubaron los fagos restantes con perlas cargadas con Ang1 biotinilada (R&D Systems, Inc.). Tras un lavado exhaustivo, se eluyeron los fagos de cada ronda de selección de una manera no específica usando disolución de trietilamina 100 mM (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO). Se amplificaron los fagos eluidos en *E. coli*, cepa XL-1 Blue MRF', se purificaron mediante precipitación y después se usaron para la siguiente ronda de selección.

Tras tres rondas de selección, se aislaron clones de fagos individuales y se analizaron mediante ELISA de fagos y secuenciación de ADN. En resumen, se recubrió proteína Ang1 sobre placas de 96 pocillos Maxisorp (marca Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) y se bloquearon con PBST (PBS con el 0,05% de Tween-20) que contenía el 4% de leche en polvo. Se incubaron sobrenadantes de fagos en los pocillos y se detectaron fagos unidos con un anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Para comprobar la reactividad cruzada frente a Ang2 o estreptavidina, se configuraron placas de control de una manera similar. Se usaron los resultados del ELISA y la secuenciación de ADN como criterios para seleccionar secuencias peptídicas para expresarlas en un formato de pepticuerpo. Se evaluaron los pepticuerpos en un ensayo de HTRF y se eligieron varios para su maduración por afinidad.

Se realizó la maduración por afinidad de péptidos generando y cribando bibliotecas de presentación en fago dopadas con nucleótidos. Se obtuvieron bibliotecas con más de  $1 \times 10^9$  transformantes independientes. Se cribaron estas bibliotecas centradas mediante un procedimiento similar al usado para cribar las bibliotecas primarias.

*Expresión y purificación de pepticuerpos.* Se expresó el pepticuerpo mL4-3 y se purificó tal como se describe en Oliner, J., *et al.* 2004., *Cancer Cell* 6:507-516. La secuencia de aminoácidos de mL4-3 es la siguiente, en la que **Fc** en negrita y cursiva indica la secuencia de Fc de IgG1 humana tal como se describió anteriormente en Oliner, I., *et al.* 2004., *Cancer Cell* 6:507-516:

MREWTEEMQVIFDAMMFGPRNDRGGSGSATGSGSTASSGSGSATHREWTEEMQ  
VIFDAMMFGPRNDRGGGGG-**Fc** (SEQ ID NO: 47)

La secuencia de aminoácidos de la parte de Fc del pepticuerpo mL4-3 es la siguiente (desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS  
LSPGK (SEQ ID NO: 48)

*Ensayo de HTRF de neutralización de angiopoyetina:Tie2.* Se mezclaron estreptavidina marcada con europio (reactivo LANCE, PerkinElmer Inc., Boston, MA) y Ang1 humana biotinilada (R&D Systems, Inc.) o Ang2 en tampón de HTRF (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM, el 0,05% de Tween 20, el 0,1% de BSA) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos en un agitador. Se mezclaron volúmenes iguales de la mezcla anterior y pepticuerpos o Fc diluidos en serie y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se mezclaron volúmenes iguales de Tie2-Fc conjugado con alofocianina (Tie2-APC) (Prozyme, San Leandro, CA) y la mezcla anterior y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los reactivos en el ensayo fueron europio-estreptavidina 4 nM, Ang1 o Ang2 biotinilada 2 nM y Tie2-APC 5 nM. Se diluyeron en

serie los peptidocuerpos desde 10.000 nM hasta 0,5 nM o de 100 nM a 0,005 nM para generar curvas de titulación completas. Se midió la neutralización de la interacción angiopoyetina:Tie2 mediante la disminución de la transferencia de energía entre APC y europio y se cuantificó usando un lector de placas Rubystar (BMG Labtechnologies, Offenberg, Alemania). Se determinó la potencia de neutralización de angiopoyetina/Tie2 calculando el porcentaje de inhibición de cada dilución de peptidocuerpo con referencia a los controles de inhibición máxima (sin angiopoyetina en la mezcla de ensayo) y mínima (sin peptidocuerpo en la mezcla de ensayo). Se calcularon valores de  $CI_{50}$  representando gráficamente el porcentaje de inhibición usando XLfit4, donde ajuste =  $A + ((B-A)/(1 + ((C/X)^D)))$  (IDBS, Guildford, R.U.).

*ELISA de neutralización de angiopoyetina:Tie2.* Se recubrieron placas de microtitulación de noventa y seis pocillos con un panel de angiopoyetinas recombinantes en medios condicionados de células 293T (DMEM/BSA 50 ug/ml) a 37°C durante 1 hora. Se usaron los medios condicionados a concentraciones de angiopoyetina que conferían el 70% de la unión máxima alcanzable a hTie2-Fc 1 nM (hTie2-Fc recombinante, n.º de catálogo 313-TI, R&D Systems Inc.). Se lavaron las placas tres veces con PBS/el 0,1% de Tween-20 y después se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con PBS/el 5% de BSA. Se eliminó la disolución de bloqueo sin lavar las placas. Se añadieron mL4-3 o Fc diluidos en serie en una disolución de Tie2-Fc 1 nM/el 1% de BSA/PBS a las placas recubiertas con angiopoyetina, que se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y después se lavaron con PBS/el 1% de Tween-20. Se añadió un anticuerpo anti-Tie2 derivado de ratón (n.º de catálogo 557039, BD Pharmingen Inc., San José, CA) a cada pocillo a una concentración final de 1 ug/ml y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las placas 3 veces con PBS/el 0,1% de Tween-20. Se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-HRP (anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa del rábano, n.º de catálogo 31432, Pierce, Rockford, IL) a una dilución de 1:10.000 en PBS/el 1% de BSA a cada pocillo y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces con PBS/el 0,1% de Tween-20 antes de añadir sustrato de TMB (SureBlue Reserve TMB, n.º de catálogo 53-00002, KPL, Gaithersburg, Maryland) y se midió la densidad óptica a 650 nm en un lector de placas (SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se determinó el grado de neutralización de angiopoyetina:Tie2 ( $CI_{50}$ ) mediante comparación con una curva patrón de Tie2 (la actividad de unión de Tie2 diluido en serie en ausencia de competidor) usando XLfit.

*Estudios con animales.* Todos los procedimientos los aprobó el Comité para el cuidado y uso de animales de Amgen y cumplieron con las normas de la Asociación para la evaluación y acreditación del cuidado de animales de laboratorio.

*Evaluación farmacocinética.* Tres ratones CD-1 recibieron una única inyección s.c. de 3,2 mg/kg de mL4-3, y dos ratas Sprague-Dawley recibieron una única inyección i.v. de 10 mg/kg de mL4-3. Se extrajeron muestras de sangre hasta 274 horas de los ratones y 336 horas de las ratas para la evaluación farmacocinética en suero. Se midieron las concentraciones de mL4-3 en muestras de suero de cada especie mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos con Ang1 humana, seguido por incubación con muestras de suero que contenían mL4-3. Tras eliminar mediante lavado cualquier sustancia no unida, se añadió anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG1 marcado con peroxidasa del rábano a los pocillos. Tras una etapa de lavado para eliminar cualquier anticuerpo monoclonal no unido, se añadió sustrato de TMB-peroxidasa a los pocillos. Se convirtieron las unidades de densidad óptica medidas a 450 - 650 nm en concentraciones mediante comparación con una curva patrón analizada simultáneamente.

Se calcularon parámetros farmacocinéticos mediante análisis no compartimental de los datos de concentración en suero-tiempo individuales (WinNonlin Professional, versión 3.3; Pharsight Corp, Mountain Vista, CA). Se calculó la semivida en fase terminal ( $t_{1/2}$ ) como  $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda_z$ , en donde  $\lambda_z$  es la constante de la velocidad de eliminación en fase terminal de primer orden estimada mediante regresión lineal de la fase de disminución logarítmica lineal terminal. Se estimó el área bajo la curva de concentración en suero-tiempo ( $AUC_{0-\text{último}}$ ) mediante el método trapezoidal lineal/logarítmico desde el momento 0 hasta el momento de la última concentración cuantificable ( $C_{\text{última}}$ ). Se estimó el  $AUC_{0-\text{inf}}$  desde el momento 0 hasta el infinito como  $AUC_{0-\text{inf}} = AUC_{0-\text{último}} + C_{\text{última}}/\lambda_z$ . Se normalizaron los valores de  $AUC_{0-\text{inf}}$  a una dosis de 1 mg/kg.

Dado que las propiedades farmacocinéticas de mL4-3, L1-7 y AMG 386 fueron diferentes, se eligieron los niveles de dosis y calendarios de cada agente, cuando fue posible, para alcanzar concentraciones  $C_{\text{min}}$  en estado estacionario en suero equimolares dentro de estudios de farmacología.

*Administración de mL4-3 a ratones preñados.* Se fecundaron dos grupos de seis ratones hembras 129/SV por machos C57BL/6. Se administraron dosis a las hembras preñadas de control de Fc 300 mg/kg o mL4-3 mediante administración s.c. en los días gestacionales E4.5, E7.5 y E11.5. Se extirparon fetos (embriones y placentas) en el día E12.5, se evaluaron para detectar anomalías macroscópicas y se fijaron mediante inmersión en IHC-zinc (tratados con mL4-3, n = 10; tratados con control de Fc, n = 10) o disolución de Bouin (tratados con mL4-3, n = 5; tratados con control de Fc, n = 6). Se cortaron en secciones gradualmente tejidos incrustados en parafina a intervalos de 50  $\mu\text{m}$  a través del corazón (embriones en la orientación tanto longitudinal como transversal) y el centro de la placenta. Se tiñeron secciones en serie de cada intervalo con hematoxilina y eosina (H&E) o se tiñeron con un procedimiento de inmunohistoquímica indirecta convencional usando anticuerpo policlonal anti-CD31 (anticuerpo monoclonal de rata anti-ratón MEC 13.3, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) para marcar específicamente vasos sanguíneos. Se establecieron criterios para puntuar los cambios evaluando secciones con conocimiento

previo del tratamiento. Posteriormente, se clasificó rápidamente la gravedad de la lesión usando una escala de niveles (mínimo, leve, moderado o marcado) y un paradigma analítico enmascarado. Se analizaron estos datos de patología ordinales usando la prueba de la Chi cuadrado contenida en el paquete de software estadístico JMP (v.5.1; SAS Institute Inc., Cary, NC). Se analizó un embrión extraído de cada madre preñada en el día E12.5 mediante ELISA usando Ang1 humana como reactivo de captura y anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG1 marcado con peroxidasa del rábano como reactivo de detección.

*Ensayo de fosforilación de Tie2.* Se analizó el efecto de los inhibidores de angiopoyetina selectivos sobre la fosforilación de Tie2 inducida por Ang1 en pulmones de ratón tal como se describe en Hodous, B.L., *et al.* 2007., J. Med Chem 50:611-626). En resumen, se trataron por vía s.c. ratones desnudos CD-1 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) una vez al día durante 23 días con control de Fc (20 mg/kg), mL4-3 (20 mg/kg) o L1-7(N) (2 mg/kg). Entonces se administraron a los ratones (n = 3 por grupo) 12 µg mediante inyección i.v. de Ang1 recombinante (R&D Systems Inc.). Quince minutos después, se extirparon los pulmones de ratón y se determinaron los niveles de Tie2 fosforilado mediante análisis de inmunoprecipitación-inmunotransferencia de tipo Western. Se realizó un análisis estadístico usando análisis de la varianza (ANOVA) seguido por prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Fisher usando el software StatView 5.0.1 (SAS Institute Inc.). Los resultados se expresan como media ± error estándar (EE).

*Modelos de xenoinjerto de tumor.* Se usaron ratones desnudos CD1 hembra de ocho a 10 semanas de edad (Charles River Laboratories) en todos los experimentos. Se inyectaron por vía s.c. a los ratones  $2 \times 10^6$  células Colo205 en un tercio del volumen de Matrigel (BD Biosciences, San José, CA). Una vez que se establecieron los tumores se administraron pepticuerpos o control de Fc mediante inyección s.c. Se administraron dosis de AMG 386 dos veces por semana; se administraron dosis de los otros pepticuerpos y control de Fc una vez al día. Cuando fue necesario, se añadió proteína de control de Fc a los grupos de tratamiento para coincidir con la cantidad total de proteína administrada en el grupo de combinación (5,2 mg/kg). Se registraron medidas tumorales y pesos corporales dos veces por semana. Todos los estudios tumorales se realizaron de manera enmascarada. Se calculó el volumen tumoral como longitud x anchura x altura en mm<sup>3</sup>. Los resultados se expresan como media ± EE. Se realizó un análisis estadístico usando análisis de medidas repetidas de la varianza seguido por una prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Scheffé usando el software StatView 5.0.1 (SAS Institute Inc.).

*Ensayo de proliferación de células endoteliales tumorales.* Se sometió a ensayo la proliferación de células endoteliales tumorales tal como se describió anteriormente (Oliner, J., *et al.* 2004., Cancer Cell 16:507-516). En resumen, se trataron sistémicamente ratones que llevaban tumor Colo205 con pepticuerpos durante 72 horas y se les implantaron bombas osmóticas que contenían BrdU 3 mg/ml 16 horas antes del sacrificio. Se extirparon los tumores, se disociaron, se fijaron y se tiñeron para permitir la determinación de la incorporación de BrdU en células endoteliales tumorales. Se realizó un análisis estadístico usando una prueba de la t para datos independientes.

*Modelo de angiogénesis corneal.* Se realizaron estudios de angiogénesis inducida por VEGF y bFGF en ratas CD hembra (n = 8 por grupo) tal como se describe en Coxon, A., *et al.* Arthritis Rheum 46:2604-2612, 2002. La inhibición de interleucina 1, pero no del factor de necrosis tumoral, suprime la neovascularización en modelos de rata de angiogénesis corneal y artritis por adyuvante. Se inició tratamiento con Fc (60 mg/kg), L1-7(N) (5 mg/kg), mL4-3 (60 mg/kg) o la combinación de L1-7(N) y mL4-3 (a las mismas dosis usadas en los grupos de agente individual) en el día antes de la cirugía y se continuó en el día 3 y el día 6. En el día 8 se terminó el estudio y se fotografiaron las córneas, tal como se describe (Oliner, J., *et al.* 2004., Cancer Cell 6:507-516). Para cada imagen de la cornea, se contó el número de vasos sanguíneos que cruzaban el punto central entre el disco implantado y el limbo. Todas las evaluaciones se realizaron de una manera enmascarada. Se evaluó la significación estadística mediante ANOVA seguido por prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Fisher.

*Neovascularización retiniana.* Se produjo retinopatía isquémica en ratones C57BL/6J usando el método descrito por Smith *et al.*, Invest. Ophthalmol Vis Sci 35: 101-111, 1994. Se colocaron crías en el día posnatal siete (P7) y sus madres en una cámara hiperóxica (el  $75 \pm 0,5\%$  de oxígeno) durante 5 días y después se devolvieron a aire ambiental durante 5 días adicionales (n = 7 crías por grupo). Se mantuvo la temperatura de la cámara entre 20°C y 22°C, y se controló constantemente el oxígeno mediante una unidad de control de oxígeno (ProOx modelo P110 acoplada a un sensor de oxígeno modelo E702 Biospherix Ltd, Redfield, NY). Una jaula con crías en P7 permaneció con aire ambiental (condición de normoxia). Se administraron por vía s.c. control de Fc (200 mg/kg), mL4-3 (100 mg/kg), L1-7(N) (100 mg/kg) o combinación de mL4-3/L1-7(N) (100 mg/kg cada uno) una vez al día durante nueve días comenzando en el P8. Desde el P8 hasta el P11 se administraron las inyecciones usando orificios para conseguir acceso a la cámara. En el P17 se sacrificaron las crías y se extirparon sus ojos y se fijaron usando agente de fijación de Davidson. Entonces se procesaron los ojos en parafina usando métodos convencionales. Se cortaron secciones graduales paralelas al eje óptico a intervalos de 100 µm. Se cortaron en secciones completamente los bloques, dando como resultado 15 ó 16 secciones por ojo. Se tiñeron todas las secciones con H&E. De los 15 ó 16 portaobjetos en la serie de secciones graduales, en los análisis se usaron los 10 portaobjetos consecutivos centrales, limitando a ambos lados el eje óptico. Para cada sección, se contó el número de núcleos vasculares (núcleos tanto endoteliales como de pericitos) que estaban en el lado del humor vítreo de la membrana limitante interna. Se registraron los recuentos de portaobjetos individuales y se sumaron los recuentos de las diez secciones para cada animal. Se contaron cinco ratones en cada grupo de estudio. Todos los recuentos se realizaron de una manera enmascarada, sin conocer las condiciones de tratamiento. Se realizó un análisis estadístico mediante

ANOVA seguido por prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Fisher.

**Angiogénesis folicular de ovarios.** Se indujo superovulación en ratones de estudio usando metodología convencional. En resumen, a ratones C57BL/6J hembra de cuatro semanas de edad se les inyectaron 5-7 UI de PMS, reiniciando eficazmente el ciclo estral. Cuarenta y ocho horas después, se inyectaron a los ratones 5 UI de HCG para inducir superovulación. Entonces se fecundaron de manera simulada las hembras y permanecieron en el estudio durante 24 horas. Se trataron los ratones del estudio con pepticuerpos dos veces al día. La administración de dosis comenzó en el momento de la inyección de PMS inicial y continuó durante dos días consecutivos, administrándose la cuarta dosis de manera simultánea con la inyección de HCG. Se sacrificaron los ratones 48 horas tras la inyección de HCG. Se extirparon los ovarios derecho e izquierdo y se fijaron mediante inmersión en disolución de zinc-tris fría. Tras 48 horas, se transfirieron los ovarios al 70% de etanol y se procesaron con parafina usando métodos convencionales. Se cortaron dos secciones secuenciales de cada par de ovarios y se tiñeron o bien individualmente con H&E o bien se inmunotiñeron para detectar endotelio vascular (CD31, anticuerpo monoclonal de rata anti-ratón MEC 13.3, BD Biosciences Pharmingen) usando DAB como cromógeno. Adicionalmente, se contratiñeron ligeramente las secciones de IHC con anticuerpo anti-CD31 con hematoxilina. Se identificaron los folículos individuales seleccionados para el análisis basándose en el estado de transformación. Esto se determinó mediante inspección enmascarada para el tratamiento de las secciones de H&E con baja potencia. Entonces se capturaron imágenes correspondientes de diez folículos transformados por animal, cuando fue viable, con un aumento de objetivo de 10x a partir de las secciones inmunoteñidas con anticuerpo anti-CD31. Se delineó el área de sección de folículo como ROI, y se determinó la fracción de área positiva para CD31 mediante determinación de umbral de RGB usando el software de análisis de imágenes MetaMorph (MetaMorph v6.1, UIC, Downingtown, PA). Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA seguido por prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett.

**Evaluación de tejidos normales en ratas tratadas.** Se evaluaron pepticuerpos en ratas SpragueDawley (Charles River Laboratories) para determinar los efectos sobre tejidos normales. Los animales recibieron por vía i.v. 300 mg/kg de AMG 386, L1-7(N) o mL4-3 dos veces por semana durante 28 días (n = 10 animales por grupo). En la autopsia programada, se cortó en secciones un conjunto completo de tejido, se tiñó y se observó para determinar cambios microscópicos.

Tabla 10

Los pepticuerpos inhiben de manera competitiva interacciones de angiopoyetina:Tie2

Agente	Cl <sub>50</sub> de hAng1 (nM)	Cl <sub>50</sub> de hAng2 (nM)
L1-7(N)	> 10.000	0,064
mL4-3	0,022	3085
AMG 386	6,2	0,029
Fc	> 10.000	> 10.000

h, humano

Tabla 11

mL4-3 neutraliza selectivamente las interacciones Ang1:Tie2

Agente	Cl <sub>50</sub> de hAng1 (nM)	Cl <sub>50</sub> de mAng1 (nM)	Cl <sub>50</sub> de rAng1 (nM)	Cl <sub>50</sub> de cAng1 (nM)	Cl <sub>50</sub> de hAng2 (nM)	Cl <sub>50</sub> de mAng2 (nM)	Cl <sub>50</sub> de cAng2 (nM)
mL4-3	0,045	0,033	0,061	0,039	1876	> 10.000	1890
Fc	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000

h, humano; m, ratón; r, conejo; c, macaco cangrejero

Tabla 12

Parámetros farmacocinéticos medios de inhibidores angiopoyetina en ratones y ratas

Agente	Ratón		Rata	
	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-inf</sub> normalizada para dosis (µM·h/mg/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-inf</sub> normalizada para dosis (µM·h/mg/kg)
mL4-3	45	5,0	42	3,6
L1-7(N) <sup>a</sup>	56	7,0	47	4,6
AMG 386 <sup>a</sup>	97	15	85	8,7

<sup>a</sup> Adaptado de Oliner *et al.* (18).

Tabla 13

La inhibición selectiva de Ang1 o Ang2 induce la atrofia de ovarios, pero no el espesamiento de la placa epifisaria

Agente	Espesamiento de la placa epifisaria (machos)	Espesamiento de la placa epifisaria (hembras)	Atrofia de ovarios
AMG 386	10	10	8
L1-7(N)	0	0	8
mL4-3	0	0	6

n = 10 por grupo

**Lista de secuencias**

- 5 <110> AMGEN INC.  
Boone, Thomas C.  
Oliner, Jonathan D.  
Lee, Eunkyung
- <120> Anticuerpos dirigidos a angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2 y usos de los mismos
- 10 <130> Documento EP71934IHVSEtop  
<140> -por asignar-  
<141> -por asignar-  
<150> Documento 09711869.9  
<151> 20-02-2009
- 15 <150> Documento PCT/US2009/001122  
<151> 20-02-2009  
<150> Documento US 61/139.361  
<151> 19-12-2008  
<150> Documento US 61/061.943
- 20 <151> 16-06-2008  
<150> Documento US 61/066.632  
<151> 20-02-2008  
<160> 48  
<170> PatentIn versión 3.4
- 25 <210> 1  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 1

ES 2 660 381 T3

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp  
 100 105 110

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

<210> 2

<211> 122

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 660 381 T3

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Gln Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

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

ES 2 660 381 T3

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

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

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Leu Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 660 381 T3

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

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 660 381 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Leu Trp  
 100 105 110

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

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

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

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

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

ES 2 660 381 T3

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Met Trp  
 100 105 110

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

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Trp Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp  
 100 105 110

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

<210> 8

<211> 112

ES 2 660 381 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ile Gln Ser Leu Leu Gln Ser  
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
85 90 95

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

5

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 9

ES 2 660 381 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Leu Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

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

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

ES 2 660 381 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

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

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

ES 2 660 381 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

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

<210> 12

<211> 112

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

ES 2 660 381 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

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

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

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

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

ES 2 660 381 T3

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
85 90 95

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

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
85 90 95

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

<210> 15

<211> 112

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

ES 2 660 381 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

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

<210> 16

<211> 112

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

ES 2 660 381 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
85 90 95

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

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly



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

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

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

<210> 22

<211> 16

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

<210> 23

15 <211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

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

20 <210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

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

25 <210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 25

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

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

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

Gly

<210> 27

10 <211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser  
 1 5

15 <210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

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

20 Gly

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 29

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

Gly

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 30

**Leu Gly Ser Asp Arg Ala Ser**  
1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

**Ala Gly Ser Asn Arg Ala Ser**  
1 5

<210> 32

<211> 13

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

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

<210> 33

20 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

**Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr**  
1 5

25 <210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

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

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

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

<210> 36

<211> 9

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Met Gln Val Thr His Trp Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 37

15 <211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

20 <210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

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

25 <210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 39

ES 2 660 381 T3

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

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

Met Gln Ala Thr His Trp Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 41

<211> 981

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (981)

15 <400> 41

gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg 48  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

agc acc tcc gag agc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gct ctg acc agc 144  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

ES 2 660 381 T3

ggc	gtg	cac	acc	ttc	cca	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	192
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
50						55					60					
ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	aac	ttc	ggc	acc	cag	acc	240
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	
65					70					75					80	
tac	acc	tgc	aac	gta	gat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	288
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
			85							90				95		
aca	gtt	gag	cgc	aaa	tgt	tgt	gtc	gag	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cca	336
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
			100					105					110			
cct	gtg	gca	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	384
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
		115					120					125				
acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	acg	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	432
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
	130					135					140					
gtg	agc	cac	gaa	gac	ccc	gag	gtc	cag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	480
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
145					150					155					160	
gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	cca	cgg	gag	gag	cag	ttc	aac	528
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	
				165					170					175		
agc	acg	ttc	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	ggt	gtg	cac	cag	gac	tgg	576
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	
			180					185					190			
ctg	aac	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	ggc	ctc	cca	624
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	
		195					200					205				
gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	acc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	672
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
	210					215					220					
cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	720
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	
225					230					235				240		
cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tac	ccc	agc	gac	atc	768
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
				245					250					255		
gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	816
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
			260					265					270			
aca	cct	ccc	atg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	864
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
		275					280					285				
ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	912
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
	290					295					300					

ES 2 660 381 T3

```
tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc      960
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305                310                315                320
```

```
tcc ctg tct ccg ggt aaa tga      981
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325
```

<210> 42

<211> 326

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

ES 2 660 381 T3

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270  
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 43

<211> 324

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (324)

<400> 43

ES 2 660 381 T3

```

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag      48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1          5          10          15

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc      96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          20          25          30

tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa      144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          35          40          45

tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc      192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          50          55          60

acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag      240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65          70          75          80

aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg      288
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          85          90          95

ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag      324
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100          105

```

<210> 44

<211> 107

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

ES 2 660 381 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 45

<211> 321

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> ( 1 ) .. (321)

10 <400> 45

ggc caa ccg aaa gcg gcg ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct 48  
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

ES 2 660 381 T3

1	5	10	15	
gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac				96
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp	20	25	30	
ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc				144
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro	35	40	45	
gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac				192
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn	50	55	60	
aag tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag				240
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys	65	70	75	80
tcc cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg				288
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val	85	90	95	
gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag				321
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	100	105		

<210> 46

<211> 106

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

ES 2 660 381 T3

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

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

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

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

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

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

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

<210> 47

<211> 72

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 47

Met Arg Glu Trp Thr Glu Glu Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Met Met  
 1 5 10 15

Phe Gly Pro Arg Asn Asp Arg Gly Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Ser  
 20 25 30

Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Arg Glu Trp  
 35 40 45

Thr Glu Glu Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Met Met Phe Gly Pro Arg  
 50 55 60

Asn Asp Arg Gly Gly Gly Gly Gly  
 65 70

<210> 48

&lt;211&gt; 227

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 48

```

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

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
          85          90          95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
          100          105          110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
          115          120          125

```

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly Lys  
 225

**REIVINDICACIONES**

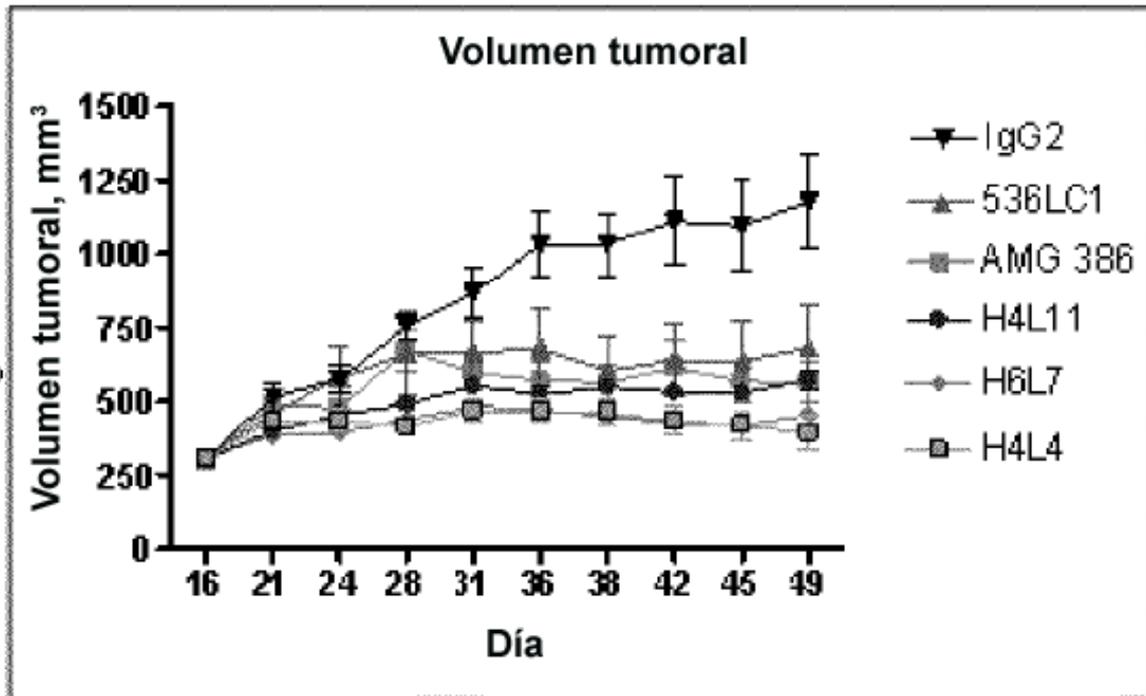
1. Anticuerpo monoclonal aislado que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que dicha cadena pesada comprende 3 CDR y dicha cadena ligera comprende 3 CDR, en el que las secuencias de dichas CDR de dicho anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste en:
- 5 (a) SEQ ID NO: 18, 26, 32 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (b) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (c) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 20, 27, 36 de la LC,  
 (d) SEQ ID NO: 18, 26, 37 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 10 (e) SEQ ID NO: 18, 26, 38 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (f) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (g) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 21, 27, 33 de la LC,  
 (h) SEQ ID NO: 18, 28, 39 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (i) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 22, 27, 33 de la LC,  
 15 (j) SEQ ID NO: 18, 26, 32 de la HC más SEQ ID NO: 22, 27, 33 de la LC,  
 (k) SEQ ID NO: 18, 29, 39 de la HC más SEQ ID NO: 19, 27, 33 de la LC,  
 (l) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 23, 27, 33 de la LC,  
 (m) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 20, 27,40 de la LC,  
 (n) SEQ ID NO: 18, 26, 32 de la HC más SEQ ID NO: 21, 27, 33 de la LC,  
 20 (o) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 24, 27, 33 de la LC,  
 (p) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 21, 27, 33 de la LC,  
 (q) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 23, 27, 33 de la LC,  
 (r) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 20, 30, 33 de la LC,  
 (s) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 25, 27, 33 de la LC,  
 25 (t) SEQ ID NO: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NO: 20, 30, 33 de la LC,  
 (u) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 20, 27, 40 de la LC, y  
 (v) SEQ ID NO: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NO: 20, 31, 33 de la LC;
- en el que dicho anticuerpo se une específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.
- 30 2. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica para el anticuerpo según la reivindicación 1.
3. Vector que contiene la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2.
4. Célula huésped que contiene el vector según la reivindicación 3.
5. Célula huésped según la reivindicación 4, que es una célula CHO.
- 35 6. Método de preparación del anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende expresar dicho anticuerpo en una célula huésped.
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha célula huésped es una célula CHO.
8. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable para el mismo.
- 40 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, que comprende además una molécula seleccionada del grupo que consiste en una molécula indicadora, un polímero soluble en agua, una región Fc de

anticuerpo y un agente citotóxico.

10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que dicho portador farmacéuticamente aceptable es un agente de formulación farmacéutico.

5 11. Cantidad terapéuticamente activa del anticuerpo según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero.

**FIGURA 1. Actividad de anticuerpos frente a angiopoyetina en xenoinjertos de tumor Colo205**

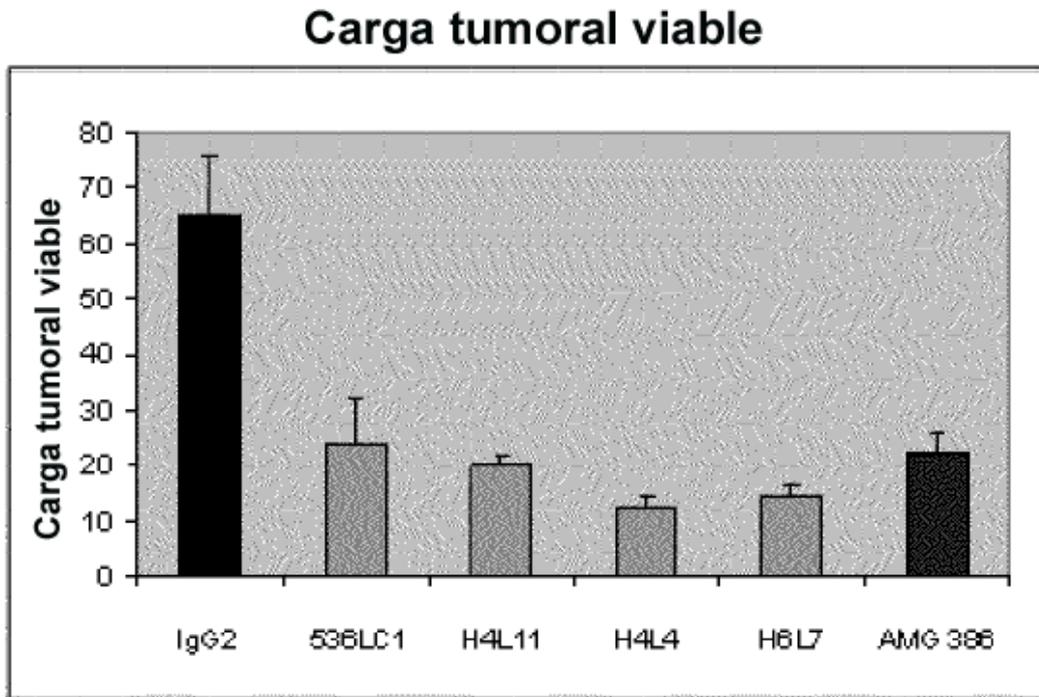


$p < 0,0001$  para todos los grupos frente a control de IgG2

$p = 0,0008$  para 536LC1 frente a H6L7

$p = 0,0009$  para 536LC1 frente a H4L4

**FIGURA 2. Carga tumoral viable de anticuerpos frente a angiopoyetina en xenoinjertos de tumor Colo205**



$p < 0,0001$  para todos los grupos frente a control de IgG2

**FIGURA 3. Efecto de anticuerpos anti-Ang-1 y/o Ang-2 sobre la proliferación de células endoteliales *in vivo***

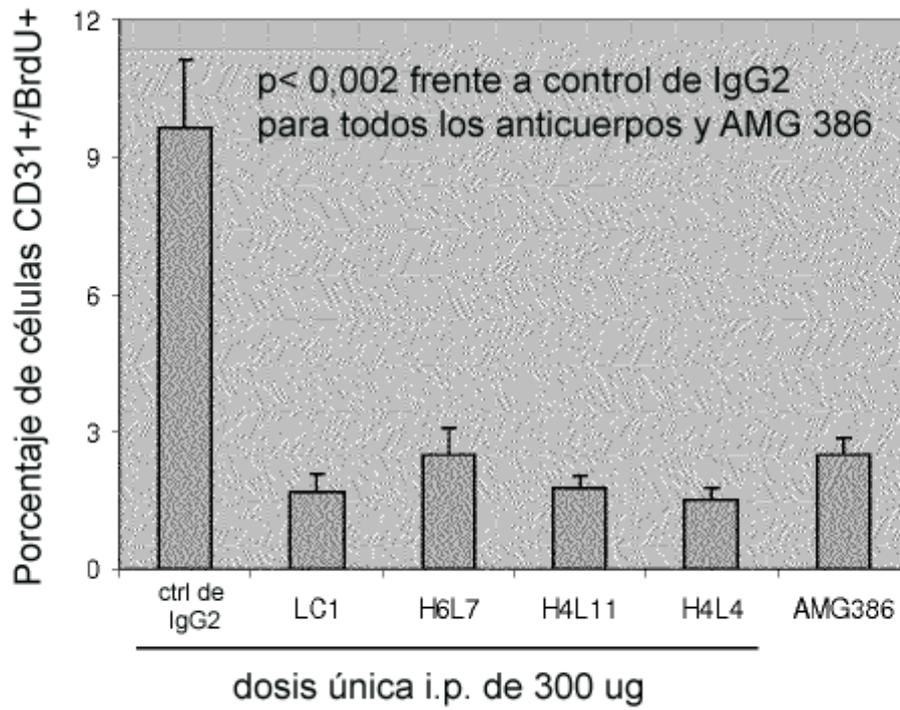
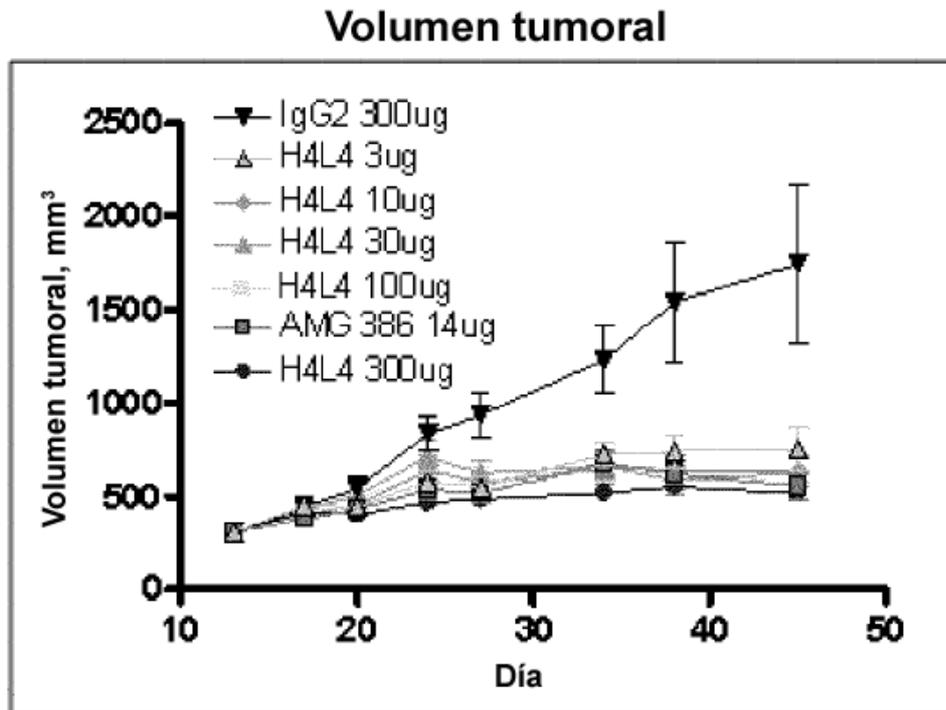
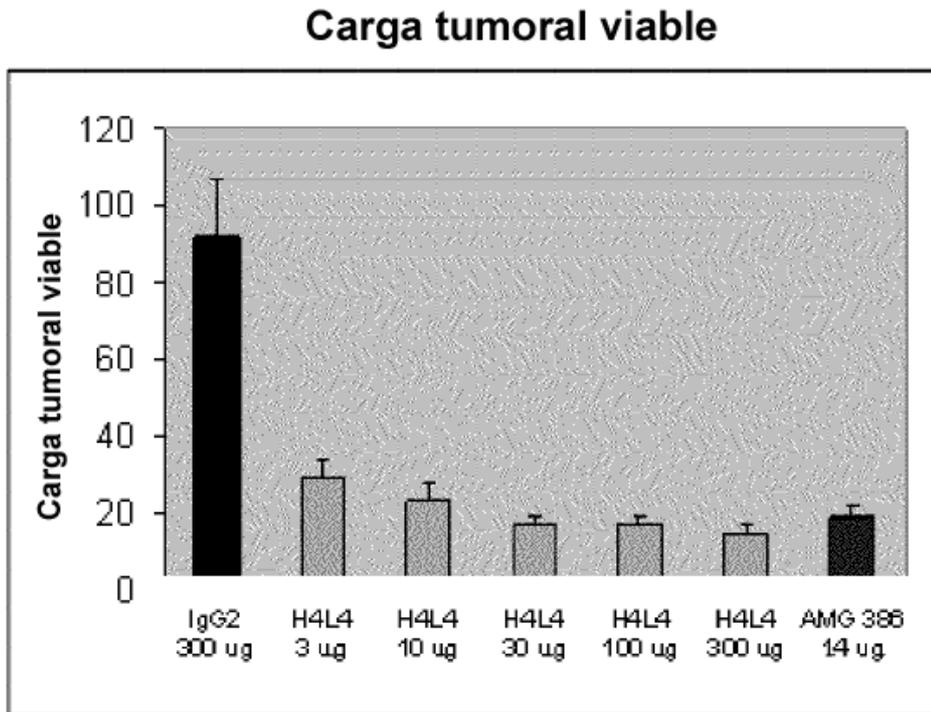


FIGURA 4. Dosis bajas de H4L4 inhiben el crecimiento de tumor Colo205



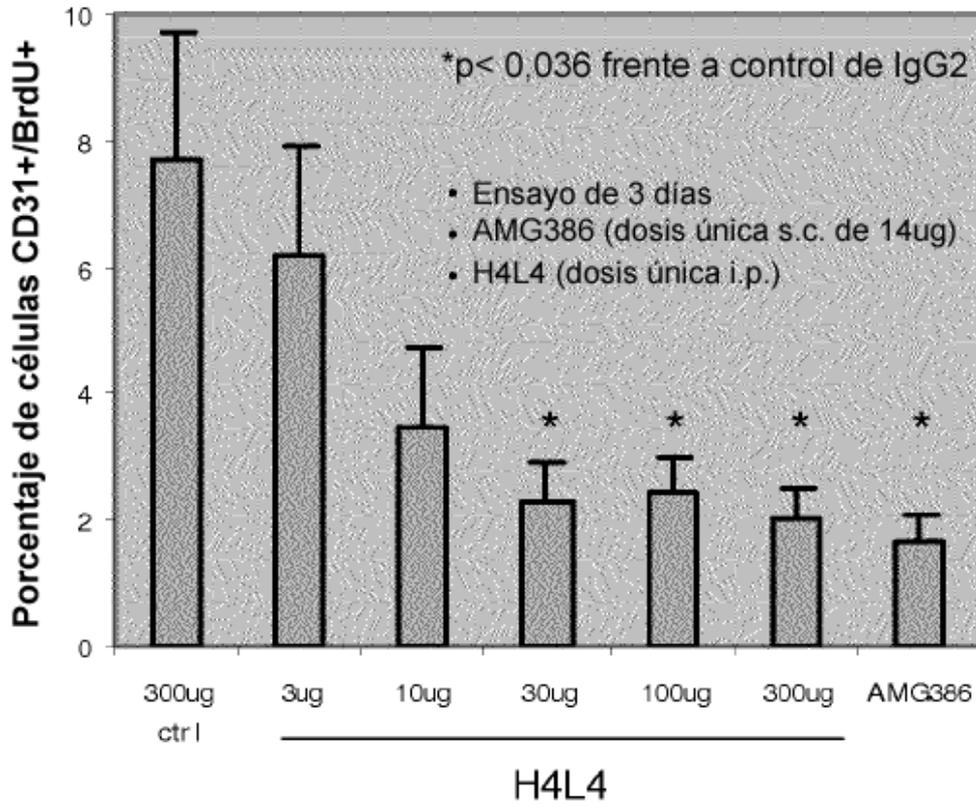
$p < 0,0001$  para todos los grupos frente a IgG2

FIGURA 5. Dosis bajas de anticuerpo H4L4 reducen la carga tumoral viable

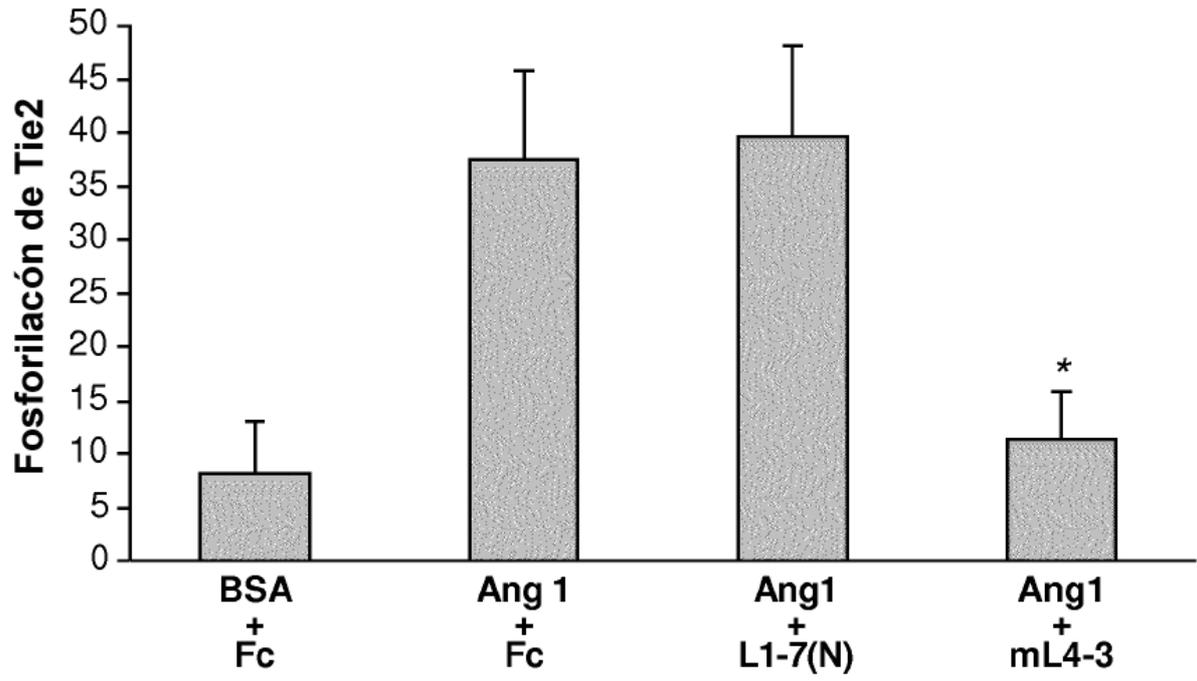


$p < 0,0001$  para todos los grupos frente a control de IgG2  
 $p = 0,028$  para 3 ug frente a 300 ug de H4L4

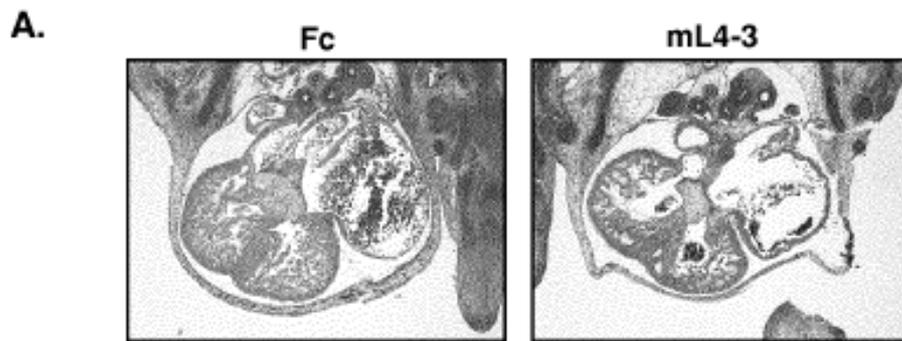
**FIGURA 6. Efecto de H4L4 sobre la proliferación de células endoteliales tumorales Colo205 *in vivo***



**Figura 7**



**Figura 8**



**B.**

<b>Aspecto cardiaco</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Incidencia</b>	
		<b>n (%)</b>	
		<b>Fc</b>	<b>mL4-3</b>
Tamaño normal, muchas trabéculas	Normal	9 (56%)	0
Tamaño normal, ligeramente menos trabéculas	Normal	6 (38%)	3 (20%)
Tamaño normal, moderadamente menos trabéculas	Normal	0	1 (7%)
Tamaño reducido, muchas menos trabéculas	Anómalo	1 (6%)	11 (73%)*
	<b>Total</b>	<b>16 (100%)</b>	<b>15 (100%)</b>

**Figura 9**

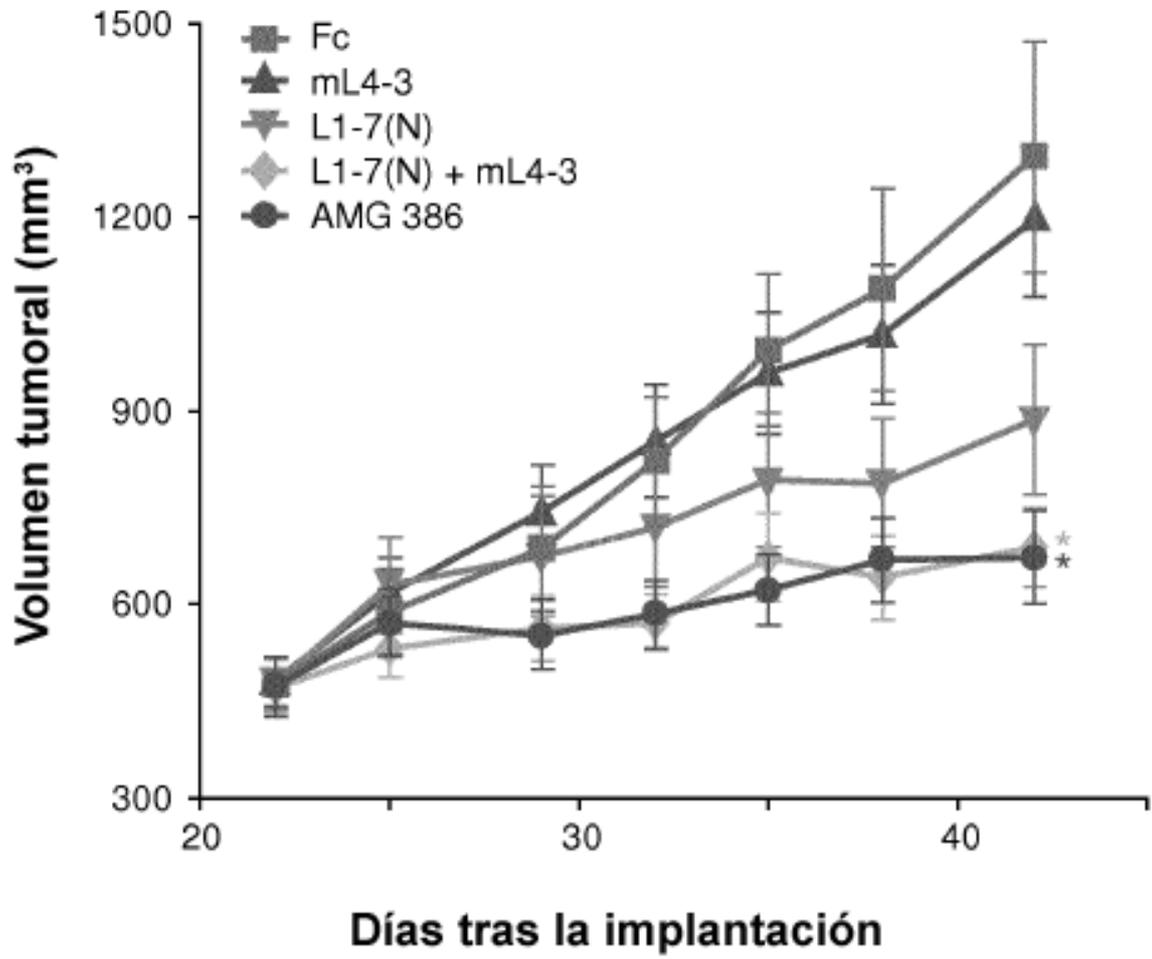
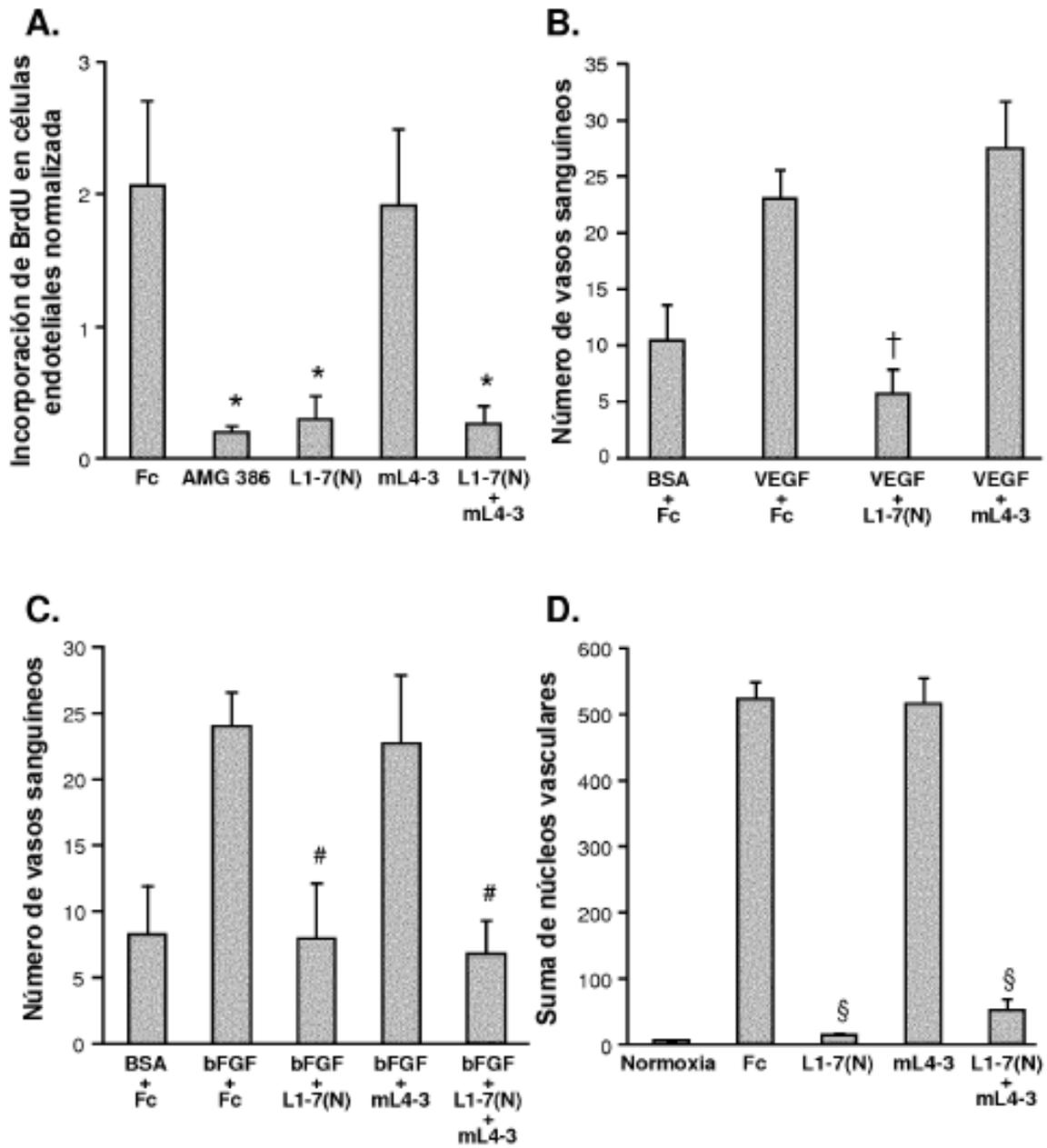


Figura 10



**Figura 11**

