(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 694 411**

(51) Int. Cl.:

***C07K 16/28*** (2006.01)
***A61K 39/395*** (2006.01)
***A61P 35/00*** (2006.01)
***C07K 14/705*** (2006.01)
***C07K 14/71*** (2006.01)
***C07K 16/40*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2012** **PCT/US2012/051038**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013** **WO13028442**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2012** **E 12753873 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018** **EP 2744827**

(54) Título: **Anticuerpos anti-Tie2 y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

**19.08.2011 US 201161525308 P**
**17.01.2012 US 201261587213 P**
**23.07.2012 US 201261674405 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**20.12.2018**

(73) Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**
**777 Old Saw Mill River Road**
**Tarrytown, NY 10591, US**

(72) Inventor/es:

**THURSTON, GAVIN**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 694 411 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 anti-Tie2 y usos de los mismos

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos, que son específicos para Tie2 humana.

### Antecedentes

La angiogénesis es el proceso biológico por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis aberrante se asocia a varias afecciones patológicas incluyendo, por ejemplo, retinopatías proliferativas, artritis reumatoide y psoriasis. Además, está bien establecido que la angiogénesis es crítica para el crecimiento y el mantenimiento tumoral. Tie2 es un único receptor transmembrana tirosina cinasa que se ha localizado en las células endoteliales de los vasos sanguíneos en formación y se ha demostrado que desempeña un papel en la angiogénesis. Los ligandos de Tie2 incluyen las angiopoyetinas (por ejemplo, Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4). Se espera que el bloqueo de la interacción entre Tie2 y uno o más de sus ligandos tenga efectos terapéuticos beneficiosos en entornos donde sea ventajoso limitar o bloquear la angiogénesis.

Se mencionan anticuerpos contra Tie2, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. N.º 6.365.154 y 6.376.653 (documento WO 00/18437). Sin embargo, sigue existiendo la necesidad en la técnica de nuevas moléculas capaces de unirse a Tie2, especialmente anticuerpos anti-Tie2 que puedan bloquear la interacción de Tie2 con uno o más ligandos de Tie2, tales como Ang2. Dichas moléculas serían útiles para diversos fines terapéuticos y de diagnóstico.

El documento WO 00/75323 desvela antagonistas de Tek y métodos de inhibición de la angiogénesis en un mamífero mediante la administración de antagonistas de Tek. El documento US 2004/0101920 desvela métodos de utilización de una plataforma de biosensores con el fin de estudiar las interacciones entre macromoléculas. El documento WO 2006/020706 desvela agentes, tales como anticuerpos, que se unen a Tie1, Tie2 y Ang, incluyendo los que inhiben la actividad de las células endoteliales y la angiogénesis. El documento WO 2010/011242 desvela métodos y kits que utilizan antagonistas de Ang-2 para el tratamiento, la inhibición y la prevención de una infección sistémica del ántrax. Feistritzer et al (2004) *J Allergy Clin. Immunol*., 114, 1077-1084 desvela los efectos de los factores de crecimiento angiogénicos angiopoyetina 1 y angiopoyetina 2 sobre la función de eosinófilos *in vitro* y la posible implicación del receptor de angiopoyetina Tie2. Reikvam et al (2010) *Expert Opin. Investig. Drugs*, 19, 169-183 desvela la investigación de los efectos de los anticuerpos que bloquean Tie2, Ang-2 exógeno y agentes farmacológicos sobre la proliferación de células de LMA y la liberación de mediadores angiorreguladores. AF313 de R&D Systems y AB10349 de Abcam son anticuerpos anti-Tie-2. Kosacka et al (2005) *Cell Tissue Res*., 320, 11-19 desvela un estudio que se centra en el efecto de Ang-1 en células ganglionares de la raíz dorsal cultivadas aisladas de ratas de un día de edad.

### Breve sumario de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos como se definen en las reivindicaciones que se unen a Tie2 humana. Los anticuerpos de la invención son útiles, entre otras cosas, para inhibir la señalización mediada por Tie2 y para tratar enfermedades y trastornos provocados por o relacionados con la actividad y/o la señalización de Tie2. Los anticuerpos de la invención bloquean la interacción entre Tie2 y Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4.

Los anticuerpos de la divulgación pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG 1 o IgG4) o pueden comprender solo una porción de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, $F(ab')_2$ o scFv) y pueden modificarse para afectar a la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar funciones efectoras residuales (Reddy et al., 2000, *J. Immunol*. 164: 1925-1933).

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-Tie2 que tienen sustancialmente las mismas características de unión que cualquiera de los anticuerpos anti-Tie2 de ejemplo que se describen en el presente documento. La presente divulgación incluye estirpes celulares que producen los anticuerpos anti-Tie2 que se describen en el presente documento. Como ejemplos no limitantes, las estirpes celulares que producen los anticuerpos de ejemplo H1M2055N y H2aM2760N se depositaron en los términos del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo) (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209 el 2 de diciembre de 2011. A las estirpes celulares depositadas se les han asignado los siguientes números de acceso: PTA-12295 (H1M2055N) y PTA-12296 (H2aM2760N).

La presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-Tie2 de ejemplo que se describen en el presente documento. Los vectores de expresión recombinantes que llevan los ácidos nucleicos de la divulgación y las células hospedadoras en las que se han introducido dichos vectores, también se incluyen en la divulgación, al igual que los métodos de producción de los anticuerpos mediante el cultivo de células hospedadoras en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos y la recuperación de los anticuerpos producidos.

La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden las secuencias de aminoácidos de las cadenas CDR pesadas y ligeras (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3) encontradas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-Tie2 de ejemplo que se describen en el presente documento, incluyendo los anticuerpos producidos por las estirpes celulares depositadas PTA12295 y PTA-12296. La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y ligera (HCVR y LCVR) encontradas en cualquiera de los anticuerpos anti-Tie2 de ejemplo que se describen en el presente documento, incluyendo los anticuerpos producidos por las estirpes celulares depositadas PTA12295 y PTA-12296.

La presente divulgación incluye cualquiera de los anticuerpos anti-Tie2 de ejemplo que se describen en el presente documento que tienen un patrón de glicosilación modificado. En algunas aplicaciones, la modificación para retirar sitios de glicosilación no deseados puede ser útil, o un anticuerpo que carece de un resto de fucosa presente en la cadena de oligosacáridos, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (véase Shield et al. (2002) *JBC* 277: 26733). En otras aplicaciones, la modificación de la galactosilación puede hacerse con el fin de modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-Tie2 de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención presenta composiciones que comprenden una combinación de un anticuerpo anti-Tie2 y un segundo agente terapéutico. Los agentes de ejemplo que pueden combinarse ventajosamente con un anticuerpo anti-Tie2 incluyen, sin limitación, otros agentes que inhiben la actividad anti-Tie2 (incluyendo otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inhibidores de péptidos, antagonistas de molécula pequeña, etc.) y/o agentes que interfieren con la señalización de Tie2 corriente arriba o abajo.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona métodos para inhibir la actividad de Tie2 usando un anticuerpo anti-Tie2 o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención, en la que los métodos terapéuticos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejore, supere, inhiba o prevenga mediante la retirada, inhibición o reducción de la actividad de Tie2. El anticuerpo anti-Tie2 de la invención actúa bloqueando la interacción entre Tie2 y un compañero de unión a Tie2 (Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4) e inhibe la actividad de señalización de Tie2.

La presente divulgación también incluye el uso de un anticuerpo anti-Tie2 o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo de la divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno relacionados con o provocados por la actividad de Tie2 en un paciente.

Otras realizaciones se harán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

**Breve descripción de las figuras**

**Fig. 1.** Representación lineal de Tie2 humana de longitud completa y diversas construcciones de supresión utilizadas para cartografiar el epítopo de los anticuerpos anti-Tie2 de la presente invención. Los números encima de las construcciones indican los límites de aminoácidos de las construcciones en relación con la molécula Tie2 de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

**Fig. 2.** Histograma que muestra el grado de unión de la angiopoyetina (hAng1, hAng2, mAng3 o hAng4) a una punta del sensor recubierta con hTie2 pretratada con el anticuerpo anti-Tie2 H4H2055N o Control I.

**Fig. 3.** Histograma que muestra el grado de unión del anticuerpo anti-Tie2 (H4H2055N o Control I) a una punta de sensor recubierta con hTie2 pretratada con 100 nM de angiopoyetina (hAng1, hAng2, mAng3 o hAng4).

**Fig. 4.** El panel A muestra las curvas de crecimiento del tumor H29 en ratones después de la administración del anticuerpo anti-Tie2 H2M2055N (■) o del control de Fc (●). La flecha hacia abajo indica la fecha de inicio del tratamiento. El panel B muestra el crecimiento del tumor desde el inicio del tratamiento en ratones tratados con anticuerpo anti-Tie2 H2M2055N o control de Fc. El asterisco (*) indica un ensayo t de dos colas no paramétrico de Mann Whitney <0,05.

**Fig. 5.** Densidad de vasos del tumor H29 medida al final del experimento en ratones tratados con anticuerpo anti-Tie2 H2M2055N o control de Fc. El asterisco (*) indica un ensayo t de dos colas no paramétrico de Mann Whitney <0,05.

**Fig. 6.** El panel A muestra las curvas de crecimiento del tumor Colo305 en ratones después de la administración del anticuerpo anti-Tie2 H2M2055N (■) o del control de Fc (●). La flecha hacia abajo indica la fecha de inicio del tratamiento. El panel B muestra el crecimiento del tumor desde el inicio del tratamiento en ratones tratados con anticuerpo anti-Tie2 H2M2055N o control de Fc. El asterisco (*) indica un ensayo t de dos colas no paramétrico de Mann Whitney <0,05.

**Fig. 7.** Densidad de vasos del tumor Colo205 medida al final del experimento en ratones tratados con anticuerpo anti-Tie2 H2M2055N o control de Fc. El asterisco (*) indica un ensayo t de dos colas no paramétrico de Mann Whitney <0,05.

**Descripción detallada**

Antes de que se describa la presente invención, ha de entenderse que la presente invención no se limita a los métodos particulares y las condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También ha de entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir solamente realizaciones particulares y no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar con respecto al valor indicado en no más del 1 %. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores entre medias (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Aunque pueden usarse cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

**Definiciones**

Las expresiones "Tie2" y "fragmento de Tie2", como se usan en el presente documento, se refieren a la proteína Tie2 humana o el fragmento a menos que se especifique que son de una especie no humana (por ejemplo, "ratón Tie2", "fragmento Tie2 de ratón", "Tie2 de mono", "fragmento de Tie2 de mono”, etc.). Un "fragmento de Tie2" es cualquier porción de Tie2 que tenga menos aminoácidos que la molécula de Tie2 de longitud completa y que es capaz de unirse a un ligando de Tie2. La Tie2 humana tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1. Las secuencias de aminoácidos de las moléculas de Tie2 de especies no humanas (por ejemplo, ratón, mono, conejo, perro, cerdo, etc.) están disponibles en fuentes públicas tales como GenBank (por ejemplo, números de acceso de GenBank NP_038718.2 (ratón); NP_001099207).1 (rata); etc).

La expresión "ligando de Tie2", como se usa en el presente documento, significa una proteína con la que la proteína Tie2 interactúa para transmitir una señal biológica *in vivo.* La expresión "ligando de Tie2" incluye cualquiera de las angiopoyetinas, incluyendo, por ejemplo, Ang1, Ang2, Ang3 y/o Ang4. El término "Ang1", como se usa en el presente documento, significa una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 o una porción de la misma que es capaz de interactuar con Tie2. El término "Ang2", como se usa en el presente documento, significa una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o una porción de la misma que es capaz de interactuar con Tie2. El término "Ang3", como se usa en el presente documento, significa una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 o una porción de la misma que es capaz de interactuar con Tie2. El término "Ang4", como se usa en el presente documento, significa una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 18 o una porción de la misma que es capaz de interactuar con Tie2.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, tiene por objeto referirse a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H, por sus siglas en inglés) y dos cadenas ligeras (L, por sus siglas en inglés) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o $V_H$, por sus siglas en inglés) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, $C_H1$, $C_H2$ y $C_H3$. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o $V_L$, por sus siglas en inglés) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio ($C_L1$). Las regiones $V_H$ y $V_L$ pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, por sus siglas en inglés). Cada $V_H$ y $V_L$ están compuestas por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes aspectos de la divulgación, las FR del anticuerpo anti-Tie2 (o la porción de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de la estirpe germinal humana o pueden modificarse natural o artificialmente. Una secuencia de consenso de aminoácidos puede definirse basándose en un análisis por pares de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usan en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína sintético o modificado por ingeniería genética, de origen natural, obtenible enzimáticamente, que se una específicamente a antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas que usan cualquier técnica convencional adecuada tales como la digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y la expresión de ADN que codifican dominios variables y opcionalmente constantes de anticuerpos. Dicho ADN es conocido y/o está fácilmente disponible, por ejemplo, de fuentes comerciales, bibliotecas

de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de fago-anticuerpo) o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para organizar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o suprimir aminoácidos, etc.

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')2; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv monocatenarias (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de la complementariedad aislada (CDR) tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas modificadas por ingeniería genética, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio único, anticuerpos suprimidos de dominio, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP, por sus siglas en inglés) y dominios IgNAR variables de tiburón, también están incluidos dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que es adyacente o está en fase de lectura con una o más secuencias marco conservadas. En los fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio $V_H$ asociado a un dominio $V_L$, los dominios $V_H$ y $V_L$ pueden estar situados uno con respecto a otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros $V_H$-$V_H$, $V_H$-$V_L$ o $V_L$-$V_L$. Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio $V_H$ o $V_L$ monomérico.

En ciertos aspectos de la divulgación, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones de ejemplo no limitantes de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) $V_H$-$C_H1$; (ii) $V_H$-$C_H2$; (iii) $V_H$-$C_H3$; (iv) $V_H$-$C_H1$-$C_H2$; (v) $V_H$-$C_H1$-$C_H2$-$C_H3$; (vi) $V_H$-$C_H2$-$C_H3$; (vii) $V_H$-$C_L$; (viii) $V_L$-$C_H1$; (ix) $V_L$-$C_H2$; (x) $V_L$-$C_H3$; (xi) $V_L$-$C_H1$-$C_H2$; (xii) $V_L$-$C_H1$-$C_H2$-$C_H3$; (xiii) $V_L$-$C_H2$-$C_H3$; y (xiv) $V_L$-$C_L$. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones de ejemplo enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar directamente unidos entre sí o pueden estar unidos por una región bisagra o enlazadora completa o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio constante y variable enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios $V_H$ o $V_L$ monoméricos (por ejemplo, mediante un puente o puentes disulfuro).

Al igual que con las moléculas de anticuerpo completo, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en los que cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítopo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpo biespecífico de ejemplo que se desvelan en el presente documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención usando técnicas habituales disponibles en la técnica.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden funcionar a través de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA). "Citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a la lisis de células que expresan antígeno por un anticuerpo de la invención en presencia de complemento. "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (CCDA) se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, por tanto, conducen a la lisis de la célula diana. La CDC y la CCDA pueden medirse usando ensayos que son bien conocidos y están disponibles en la técnica. (Véase, por ejemplo, el documento US 5.500.362 y el documento 5.821.337, y Clynes et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (*USA)* 95: 652-656). La región constante de un anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo para arreglar el complemento y mediar la citotoxicidad dependiente de las células. Por tanto, el isotipo de un anticuerpo puede seleccionarse basándose en si es deseable que el anticuerpo medie la citotoxicidad.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, tiene por objeto incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo),* por ejemplo, en las CDR y, en particular, CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no tiene por objeto incluir

anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco conservadas humanas.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, tiene por objeto incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (se describe más adelante), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes (se describe más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor et al. (1992) *Nucl. Acids Res*. 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Sin embargo, en ciertos aspectos, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones $V_H$ y $V_L$ de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias $V_H$ y $V_L$ de la estirpe germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la estirpe germinal de anticuerpos humanos *in vivo.*

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que se asocian a la heterogeneidad de la bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción estable de cuatro cadenas de aproximadamente 150-160 kDa en la que los dímeros se mantienen unidos por un enlace disulfuro de cadena pesada intercatenario. En una segunda forma, los dímeros no están unidos a través de enlaces disulfuro intercatenarios y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta por una cadena ligera y pesada (semianticuerpo) acoplada covalentemente. Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de purificación por afinidad.

La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos de IgG intactos se debe, pero no se limita a, diferencias estructurales asociadas al isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una única sustitución de aminoácido en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30: 105) a niveles observados normalmente usando una bisagra de IgG1 humana. La presente divulgación abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la región $C_H2$ o $C_H3$, bisagra, que pueden ser deseables, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su ambiente natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o retirado de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en los que el anticuerpo existe naturalmente o se produce naturalmente, es un "anticuerpo aislado" para los fines de la presente invención. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo ciertas realizaciones, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

La expresión "se une específicamente" o similar, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Los métodos para determinar si un anticuerpo se une específicamente a un antígeno son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. Por ejemplo, un anticuerpo que "se une específicamente" a Tie2 humana, como se usa en el contexto de la presente invención, incluye anticuerpos que se unen a Tie2 humana o una porción del mismo con una $K_D$ inferior a aproximadamente 1000 nM, inferior a aproximadamente 500 nM, inferior a aproximadamente 300 nM, inferior a aproximadamente 200 nM, inferior a aproximadamente 100 nM, inferior a aproximadamente 90 nM, inferior a aproximadamente 80 nM, inferior a aproximadamente 70 nM, inferior a aproximadamente 60 nM, inferior a aproximadamente 50 nM, inferior a aproximadamente 40 nM, inferior a aproximadamente 30 nM, inferior a aproximadamente 20 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, inferior a aproximadamente 4 nM, inferior a aproximadamente 3 nM, inferior a aproximadamente 2 nM, inferior a aproximadamente 1 nM o inferior a aproximadamente 0,5 nM, como se mide en un ensayo de resonancia de plasmón superficial. (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 2, en el presente documento). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a Tie2 humana puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las moléculas de Tie2 de otras especies (no humanas).

Un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueador", como se usa en el presente documento, tiene por objeto referirse a un anticuerpo cuya unión a Tie2: (i) interfiere con la interacción entre Tie2 o un fragmento de Tie2 y un ligando de Tie2 (por ejemplo, una angiopoyetina), y/o (ii) da como resultado la inhibición de al menos una función biológica de Tie2. La inhibición provocada por un anticuerpo neutralizante o bloqueador de Tie2 no necesita estar completa siempre y cuando sea detectable usando un ensayo apropiado. Se describen ensayos de ejemplo para detectar la inhibición de

TIE2 en el presente documento.

Los anticuerpos anti-Tie2 que se desvelan en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o supresiones de aminoácidos en las regiones marco conservadas y/o CDR de los dominios variables de la cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la estirpe germinal correspondientes de las que derivaron los anticuerpos. Dichas mutaciones pueden determinarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos que se desvelan en el presente documento con las secuencias de la estirpe germinal disponibles de, por ejemplo, bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se desvelan en el presente documento, en los que uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco conservadas y/o CDR están mutados con respecto al resto o los restos correspondientes de la secuencia de la estirpe germinal de la que derivó el anticuerpo, o con respecto al resto o los restos correspondientes de otra secuencia de la estirpe germinal humana, o con respecto a una sustitución conservadora de aminoácidos del resto o los restos correspondientes de la estirpe germinal (dichos cambios de secuencia se denominan en el presente documento de forma colectiva "mutaciones de la estirpe germinal"). Un experto habitual en la materia, comenzando con las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que se desvelan en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones de estirpe germinal individuales o combinaciones de las mismas. En ciertos aspectos de la divulgación, todos los restos de región marco conservada y/o CDR dentro de los dominios $V_H$ y/o $V_L$ mutan de nuevo a los restos encontrados en la secuencia de la estirpe germinal original de la que derivó el anticuerpo. En otros aspectos, solo ciertos restos mutan de nuevo a la secuencia original de la estirpe germinal, por ejemplo, solo los restos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los restos mutados descubiertos dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros aspectos, uno o más de los restos de la región marco conservada y/o CDR mutan al resto o restos correspondientes de una secuencia de estirpe germinal diferente (es decir, una secuencia de estirpe germinal que es diferente de la secuencia de estirpe germinal de la que el anticuerpo derivó originalmente). Además, los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la estirpe germinal dentro las regiones marco conservadas y/o CDR, por ejemplo, en las que ciertos restos individuales mutan al resto correspondiente de una secuencia particular de la estirpe germinal mientras que ciertos otros restos que difieren de la secuencia original de la estirpe germinal se mantienen o mutan al resto correspondiente de una secuencia diferente de la estirpe germinal. Una vez obtenidos, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la estirpe germinal pueden someterse a ensayo fácilmente para determinar una o más propiedades deseadas, tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o potenciadas (según sea el caso), inmunogenia reducida, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general se incluyen en la presente divulgación.

La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-Tie2 que comprenden variantes que tienen una o más sustituciones conservadoras en comparación con las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR encontradas dentro de los anticuerpos anti-Tie2 de ejemplo que se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-Tie2 que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones conservadoras de aminoácidos con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR de los anticuerpos anti-Tie2 que se desvelan en el presente documento.

La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo, usando el sistema BIAcore™ (Biacore Life Sciences división de GE Healthcare, Piscataway, NJ).

El término "$K_D$", como se usa en el presente documento, tiene por objeto referirse a la constante de disociación en equilibrio de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátopo. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo. Por tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítopos pueden ser ya sea conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional es producido por aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítopo lineal es uno producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En ciertas circunstancias, un epítopo puede incluir restos de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea de manera óptima con inserciones o supresiones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 95 % y, más preferentemente, de al menos aproximadamente el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de las bases de nucleótidos, como se mide por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de

secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza más adelante. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tenga la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar al polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Cuando se aplica a los polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de manera óptima, tal como los programas GAP o BESTFIT que usan pesos de hueco predeterminados, comparten al menos el 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o el grado de similitud puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol*. 24: 307-331. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo alifático: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato y (7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Son grupos de sustitución conservadora de aminoácidos preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 desvelada en Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para los polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia, se mide normalmente usando un software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, supresiones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit que pueden usarse con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como los polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos también pueden compararse usando FASTA usando parámetros predeterminados o recomendados, un programa en GCG versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson (2000) citado anteriormente). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros predeterminados. Véase, por ejemplo, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402.

**Características biológicas de los anticuerpos**

La presente invención proporciona anticuerpos que bloquean la interacción entre Tie2 y un ligando de Tie2. Como se usa en el presente documento, la expresión "bloquea la interacción entre Tie2 y un ligando de Tie2" significa que, en un ensayo en el que la interacción física entre Tie2 y un ligando de Tie2 puede detectarse y/o cuantificarse, la adición de un anticuerpo de la invención reduce la interacción entre Tie2 y el ligando de Tie2 (por ejemplo, Ang1, Ang2, Ang3 y/o Ang4) en al menos un 50 %. Un ensayo de ejemplo no limitante que puede usarse para determinar si un anticuerpo bloquea la interacción entre Tie2 humana y un ligando de Tie2 se ilustra en el Ejemplo 5, en el presente documento. En una realización de ejemplo de este formato de ensayo, los anticuerpos se mezclan con proteína Tie2 y después la mezcla anticuerpo/Tie2 se aplica a una superficie recubierta con un ligando Tie 2 (en este caso, proteína Ang2). Después de retirar por lavado las moléculas no unidas, se mide la cantidad de Tie2 unida a la superficie recubierta con Ang2. Mediante el uso de cantidades variables de anticuerpo en este formato de ensayo, la cantidad de anticuerpo necesaria para bloquear el 50 % de la unión de Tie2 a Ang2 puede calcularse y expresarse como un valor de $CI_{50}$. El formato de este ensayo puede invertirse de manera que se recubra la superficie con Tie2, se añada anticuerpo a la superficie recubierta con Tie2, el anticuerpo no unido se retire por lavado y, después, se añada un ligando de Tie2 a la superficie de Tie2 tratada con anticuerpo. La presente invención proporciona anticuerpos anti-Tie2 que presentan una $CI_{50}$ inferior a aproximadamente 100 nM cuando se analizan en un ensayo de unión de Tie2/ligando de Tie2 como se ilustra en el Ejemplo 5 o un ensayo sustancialmente similar. Por ejemplo, la divulgación incluye anticuerpos anti-Tie2 que presentan una $CI_{50}$ inferior a aproximadamente 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,4, 0,3 o 0,2 nM cuando se analizan en un ensayo de unión de Tie2/ligando de Tie2 como se ilustra en el Ejemplo 5 o un ensayo substancialmente similar.

Otro formato de ensayo que puede usarse para determinar si un anticuerpo bloquea la interacción entre Tie2 humana y un ligando de Tie2 se ilustra en el Ejemplo 6, en el presente documento. En este formato de ensayo, se usa una estirpe celular que se modifica por ingeniería genética para expresar Tie2 humana en su superficie y que también incluye una construcción indicadora que hace que se exprese una señal detectable cuando Tie2 interactúa con un ligando de Tie2. Las células modificadas se tratan con anticuerpos anti-Tie2 y con ligando de Tie2 y se mide la señal indicadora. Mediante el uso de cantidades variables de anticuerpo en este formato de ensayo, la cantidad de anticuerpo necesaria para inhibir el 50 % de la señal indicadora observada en ausencia de anticuerpo puede calcularse y expresarse como un valor de $CI_{50}$. La presente invención proporciona anticuerpos anti-Tie2 que presentan una $CI_{50}$ inferior a aproximadamente 20 nM cuando se analizan en un ensayo de unión de Tie2/ligando de Tie2 como se ilustra en el Ejemplo 6 o un ensayo sustancialmente similar. Por ejemplo, la divulgación incluye anticuerpos anti-Tie2 que presentan una $CI_{50}$ inferior a aproximadamente 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 nM cuando se someten a ensayo en un ensayo de unión de Tie2/ligando de Tie2 como se describe en el Ejemplo 6 o un ensayo sustancialmente similar.

**Cartografiado de epítopos y tecnologías relacionadas**

La proteína Tie2 humana contiene los siguientes dominios: un dominio Ig1, un dominio Ig2, un dominio de repetición de EGF, un dominio Ig3 y un dominio de repetición de fibronectina (FN) (que incluye FN1, FN2 y FN3). Estos dominios se representan gráficamente en la Figura 1. La presente divulgación incluye anticuerpos anti-Tie2 que se unen específicamente a un epítopo dentro de una o más de las siguientes regiones: (a) los dominios Ig1-Ig2-EGF (SEQ ID NO: 7); (b) los dominios de Ig2-EGF (SEQ ID NO: 8); (c) el dominio EGF (SEQ ID NO: 9); (d) los dominios Ig3-FN (SEQ ID NO: 10); y/o (e) los dominios FN (SEQ ID NO: 11). (Véanse los ejemplos 3 y 4).

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-Tie2 que interactúan con uno o más aminoácidos encontrados dentro de los dominios Ig1 y/o Ig2 de Tie2. El epítopo o epítopos pueden consistir en una o más secuencias contiguas de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos ubicadas dentro de los dominios Ig1 y/o Ig2 de Tie2. Como alternativa, el epítopo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) localizados dentro de los dominios Ig1 y/o Ig2 de Tie2. De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, se proporcionan anticuerpos anti-Tie2 que interactúan con uno o más aminoácidos ubicados dentro de uno o más segmentos de aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en los aminoácidos 96-106 de la SEQ ID NO: 7, los aminoácidos 139-152 de la SEQ ID NO: 7; y los aminoácidos 166-175 de la SEQ ID NO: 7. La presente invención proporciona anticuerpos anti-Tie2 que interactúan con al menos un aminoácido dentro de cada uno de los segmentos mencionados anteriormente (es decir, dentro de cada uno de los aminoácidos 96-106, 139-152 y 166-175 de la SEQ ID NO: 7). Los anticuerpos que interactúan con los aminoácidos 139-152 y/o 166-175 de la SEQ ID NO: 7 son capaces de bloquear la interacción entre Tie2 y uno o más ligandos Tie2, tales como, por ejemplo, Ang2 (véanse los Ejemplos 4-6, en el presente documento).

Pueden usarse diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia para determinar si un anticuerpo "interactúa con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas de ejemplo incluyen, por ejemplo, un ensayo de bloqueo cruzado habitual como el que se describe en *Antibodies*, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análisis mutacional por rastreo con alanina, análisis por transferencias de péptidos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443-463) y análisis por corte de péptidos. Además, pueden emplearse métodos tales como la escisión de epítopos, la extracción de epítopos y la modificación química de antígenos (Tomer, 2000, *Protein Science* 9: 487-496). Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 4 del presente documento). En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica marcar con deuterio la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo proteína/anticuerpo se transfiere a agua para permitir que se produzca un intercambio de hidrógeno-deuterio en todos los restos, excepto los restos protegidos por el anticuerpo (que permanecen marcados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión de proteasas y análisis por espectrometría de masas, revelando de este modo los restos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Véase, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2): 252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

La presente divulgación incluye anticuerpos anti-Tie2 que se unen al mismo epítopo que cualquiera de los anticuerpos de ejemplo específicos que se describen en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos H1M2055N y H2aM2760N, producidos a partir de las estirpes celulares depositadas PTA-12295 y PTA-12296, respectivamente). Análogamente, la presente divulgación también incluye anticuerpos anti-Tie2 que compiten por la unión a Tie2 o un fragmento de Tie2 con cualquiera de los anticuerpos de ejemplo específicos que se describen en el presente documento (por ejemplo, los anticuerpos H1M2055N y H2aM2760N, producidos a partir de las estirpes celulares depositadas PTA-12295 y PTA-12296, respectivamente).

Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítopo o compite por unirse con un anticuerpo anti-Tie2 de referencia usando métodos habituales conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de ensayo se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti-Tie2 de referencia de la invención, se permite

que el anticuerpo de referencia se una a una proteína Tie2 o péptido en condiciones de saturación. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de ensayo para unirse a la molécula de Tie2. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de unirse a Tie2 después de la unión a saturación con el anticuerpo anti-Tie2 de referencia, puede concluirse que el anticuerpo de ensayo se une a un epítopo diferente al del anticuerpo anti-Tie2 de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de ensayo no puede unirse a la molécula Tie2 después de la unión a saturación con el anticuerpo anti-Tie2 de referencia, entonces el anticuerpo de ensayo puede unirse al mismo epítopo que el epítopo unido por el anticuerpo anti-Tie2 de referencia de la invención. Después puede realizarse una experimentación adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo de ensayo se debe de hecho a la unión al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Pueden realizarse experimentos de este tipo usando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de unión de anticuerpos disponible en la técnica. De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, dos anticuerpos se unen al mismo epítopo (o superpuesto) si, por ejemplo, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos un 50 % pero preferentemente un 75 %, un 90 % o incluso un 99 % según se mide en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans et al., *Cancer Res*. 1990: 50: 1495-1502). Como alternativa, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Se considera que dos anticuerpos tienen "epítopos superpuestos" si solo un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

Para determinar si un anticuerpo compite por la unión con un anticuerpo anti-Tie2 de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos orientaciones: en una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una molécula de Tie2 en condiciones de saturación seguidas de una evaluación de unión del anticuerpo de ensayo a la molécula de Tie2. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de ensayo se una a una molécula de Tie2 en condiciones de saturación, seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de Tie2. Si, en ambas orientaciones, solo el primer anticuerpo (de saturación) es capaz de unirse a la molécula de Tie2, entonces se concluye que el anticuerpo de ensayo y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a Tie2. Como apreciará un experto en la materia, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia puede no unirse necesariamente al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia mediante la unión de un epítopo superpuesto o adyacente.

**Preparación de anticuerpos humanos**

Se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos monoclonales completamente humanos. Puede usarse cualquiera de dichos métodos conocidos en el contexto de la presente invención para hacer anticuerpos humanos que se unan específicamente a Tie2 humana.

Usando la tecnología VELOCIMMUNE™ o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad para Tie2 inicialmente teniendo una región variable humana y una región constante de ratón. Como en la sección experimental a continuación, los anticuerpos se caracterizan y se seleccionan por características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítopo, etc. Las regiones constantes del ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano de la invención, por ejemplo, IgG 1 o IgG4 de tipo silvestre o modificado. Si bien la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y especificidad de diana residen en la región variable.

**Bioequivalentes**

Los anticuerpos anti-Tie2 y los fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos pero que conservan la capacidad de unirse a Tie2 humana. Dichos anticuerpos variantes y fragmentos de anticuerpos comprenden una o más adiciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia original, pero presentan una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Análogamente, las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-Tie2 de la presente divulgación abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, supresiones o sustituciones de nucleótidos cuando se comparan con la secuencia descrita, pero que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-Tie2 que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo anti-Tie2 o fragmento de anticuerpo de la invención.

Dos proteínas de unión a antígeno, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea en una sola dosis o múltiples dosis. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción, pero no en su tasa de absorción y, sin embargo, pueden considerarse bioequivalentes debido a que dichas diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el marcado, no son esenciales para conseguir concentraciones eficaces de fármaco en el cuerpo en, por ejemplo, el

uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el fármaco particular estudiado.

En un aspecto de la divulgación, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia.

En un aspecto de la divulgación, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiarse una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenia, o eficacia disminuida, en comparación con la terapia continua sin dicho cambio.

En un aspecto de la divulgación, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan mediante un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la condición o condiciones de uso, en la medida en que se conozcan dichos mecanismos.

La bioequivalencia puede demostrarse mediante métodos in vivo e in vitro. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) un ensayo in vivo en seres humanos u otros mamíferos, en el que la concentración del anticuerpo o sus metabolitos se mide en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) un ensayo in vitro que se ha correlacionado con, y es razonablemente predictivo de, los datos de biodisponibilidad in vivo en seres humanos; (c) un ensayo in vivo en seres humanos u otros mamíferos en el que el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) se mide en función del tiempo; y (d) un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

Pueden construirse variantes bioequivalentes de anticuerpos anti-Tie2 de la invención, por ejemplo, haciendo diversas sustituciones de restos o secuencias o suprimiendo restos o secuencias terminales o internos no necesarios para la actividad biológica. Por ejemplo, los restos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica pueden suprimirse o reemplazarse por otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos anti-Tie2 que comprenden cambios de aminoácidos que modifican las características de glucosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o retiran la glucosilación.

**Selectividad de especies y reactividad cruzada de especies**

De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, los anticuerpos anti-Tie2 se unen a Tie2 humana pero no a Tie2 de otras especies. La presente invención proporciona anticuerpos anti-Tie2 que se unen a Tie2 humana y a Tie2 de una o más especies no humanas. Los anticuerpos anti-Tie2 de la invención se unen específicamente a Tie2 humana, así como a un Tie2 de roedor (por ejemplo, Tie2 de ratón o rata). Una construcción de ejemplo que puede usarse para determinar si un anticuerpo se une específicamente a Tie2 de ratón es la construcción que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; una construcción de ejemplo que puede usarse para determinar si un anticuerpo se une específicamente a Tie2 de rata es la construcción que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. El uso de estas construcciones para evaluar la unión del anticuerpo anti-Tie2 se ilustra en el Ejemplo 2, en el presente documento.

**Inmunoconjugados**

La invención abarca anticuerpos monoclonales anti-Tie2 conjugados con un resto terapéutico ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterápico, un inmunosupresor o un radioisótopo. Los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Se conocen en la técnica ejemplos de agentes citotóxicos y agentes quimioterápicos adecuados para formar inmunoconjugados (véase, por ejemplo, el documento WO 05/103081).

**Anticuerpos multiespecíficos**

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt et al., 1991, *J. Immunol*. 147: 60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol*. 22: 238-244. Los anticuerpos anti-Tie2 de la presente invención pueden unirse o coexpresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede estar unido funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una segunda especificidad de unión. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos biespecíficos en los que un brazo de una inmunoglobulina es específico para Tie2 humana o un fragmento del mismo y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para una segunda diana terapéutica o está conjugado con un resto terapéutico tal como un inhibidor de la tripsina.

Un formato de anticuerpo biespecífico de ejemplo que puede usarse en el contexto de la presente invención implica el uso de un primer dominio $C_H3$ de inmunoglobulina (Ig) y un segundo dominio $C_H3$ de Ig, en el que los dominios $C_H3$ de Ig primero y segundo difieren entre sí en al menos un aminoácido y en el que al menos una diferencia de aminoácidos reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácidos. En una realización, el primer dominio $C_H3$ de Ig se une a la proteína A y el segundo dominio $C_H3$ de Ig contiene una mutación que reduce o suprime la unión a proteína A tal como una modificación H95R (por numeración de exones IMGT; H435R por numeración EU). El segundo $C_H3$ puede comprender adicionalmente una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Modificaciones adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo $C_H3$ incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG 1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG4. Se contemplan variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico descrito anteriormente.

**Formulación y administración terapéutica**

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-Tie2 de los mismos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una transferencia, entrega, tolerancia y similares mejoradas. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Véase también Powell et al. "*Compendium of excipients for parenteral formulations*" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52: 238-311.

La dosis de anticuerpo administrada a un paciente puede variar dependiendo de la edad y el tamaño del paciente, la enfermedad diana, las condiciones, la vía de administración y similares. La dosis preferida se calcula normalmente de acuerdo con el peso corporal o el área de la superficie corporal. Cuando un anticuerpo de la presente invención se usa para tratar una afección o enfermedad asociada a la actividad de Tie2 en un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar el anticuerpo de la presente invención normalmente por vía intravenosa en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 7, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, la frecuencia y la duración del tratamiento pueden ajustarse. Las dosificaciones y las pautas eficaces para administrar los anticuerpos Tie2 pueden determinarse empíricamente; por ejemplo, el progreso del paciente puede controlarse mediante evaluación periódica y ajustarse la dosis en consecuencia. Además, la modificación a escala de la dosis entre especies puede realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res*. 8: 1351).

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem*. 262: 4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede entregarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringuilla convencionales. Además, con respecto a la entrega subcutánea, un dispositivo de entrega de pluma tiene fácilmente aplicaciones en la entrega de una composición farmacéutica de la presente invención. Un dispositivo de entrega de pluma de este tipo puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de entrega de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica de dentro del cartucho y el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y reemplazarse por un nuevo cartucho que contenga la composición farmacéutica. El dispositivo de entrega de pluma puede reutilizarse. En un dispositivo de entrega de pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. En su lugar, el dispositivo de entrega de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica contenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, se desecha todo el dispositivo.

Numerosos dispositivos de entrega de pluma y autoinyectores reutilizables tienen aplicaciones en la entrega subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co.,

Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de entrega de pluma desechables que tienen aplicaciones en la entrega subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y KWIKPEN™ (Eli Lilly), el Autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.) y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar solo algunos.

En ciertas situaciones, la composición farmacéutica puede entregarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng*. 14: 201). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos; véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Ratón, Florida. En otra realización más, puede colocarse un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana de la composición, por lo que se requiere solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, volumen 2, páginas 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos públicamente conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio aceitoso utilizado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes adyuvantes, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que puede usarse en combinación con un agente solubilizante tal como el benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de este modo se rellena preferentemente en una ampolla apropiada.

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para el uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para adaptarse a una dosis de los principios activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente contenido es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo mencionado anteriormente esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas de dosificación.

**Usos terapéuticos de los anticuerpos**

Los anticuerpos de la invención son útiles, entre otras cosas, para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado a la actividad de Tie2, incluyendo enfermedades o trastornos asociados a la angiogénesis. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden usarse para tratar, por ejemplo, tumores primarios y/o metastáticos que surgen en el cerebro y las meninges, orofaringe, pulmón y árbol bronquial, tracto gastrointestinal, tracto reproductivo masculino y femenino, músculo, huesos, piel y apéndices, tejido conectivo, bazo, sistema inmunitario, células formadoras de sangre y médula ósea, hígado y tracto urinario y órganos sensoriales especiales tales como el ojo. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la invención se usan para tratar uno o más de los siguientes cánceres: carcinoma de células renales, carcinoma pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, gliomas malignos, osteosarcoma, cáncer colorrectal, mesotelioma maligno, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, sarcoma sinovial, cáncer de tiroides o melanoma.

**Terapias de combinación**

La presente divulgación incluye pautas de administración terapéutica que comprenden administrar un anticuerpo antiTie2 de la presente invención en combinación con al menos un componente terapéuticamente activo adicional. Los ejemplos no limitantes de dichos componentes terapéuticamente activos adicionales incluyen, por ejemplo, otro antagonista de Tie2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-Tie2), un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, anticuerpo anti-EGFR [por ejemplo, cetuximab o panitumumab] o inhibidor de molécula pequeña de la actividad de EGFR [por ejemplo, gefitinib o erlotinib]), un antagonista de otro miembro de la familia de EGFR tal como Her2/ErbB2, ErbB3 o ErbB4 (por ejemplo, anticuerpo anti-ErbB2, anti-ErbB3 o anti-ErbB4 o inhibidor de molécula pequeña de la actividad de ErbB2, ErbB3 o ErbB4), un antagonista de EGFRvIII (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a EGFRvIII), un antagonista de cMET (por ejemplo, un anticuerpo anti-cMET), un antagonista de IGF1R (por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF1R), un inhibidor de B-raf (por

ejemplo, vemurafenib, sorafenib, GDC-0879, PLX-4720), un inhibidor de PDGFR-α (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR-α), un inhibidor de PDGFR-β (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR-β), un antagonista de VEGF (por ejemplo, una trampa de VEGF, véase, por ejemplo, el documento US 7.087.411 (también denominado en el presente documento una "proteína de fusión inhibidora de VEGF"), anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab), un inhibidor de cinasa de molécula pequeña del receptor de VEGF (por ejemplo, sunitinib, sorafenib o pazopanib), un antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-DLL4 desvelado en el documento US 2009/0142354 tal como REGN421), un antagonista de Ang2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-Ang2 desvelado en el documento US 2011/0027286 tal como H1H685P), etc. Otros agentes que pueden administrarse de manera beneficiosa en combinación con los anticuerpos anti-Tie2 de la invención incluyen inhibidores de citocinas, incluyendo inhibidores de citocinas de molécula pequeña y anticuerpos que se unen a citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 o a sus respectivos receptores.

La presente invención también incluye combinaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-Tie2 mencionados en el presente documento y un inhibidor de uno o más de entre VEGF, Ang2, DLL4, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR-α, PDGFR-β o cualquiera de las citocinas mencionadas anteriormente, en las que el inhibidor es un aptámero, una molécula antisentido, una ribozima, un ARNip, un pepticuerpo, un nanocuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fab; fragmento $F(ab')_2$; Fragmento Fd; Fragmento Fv; ScFv; Fragmento dAb; u otras moléculas modificadas por ingeniería genética, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y unidades de reconocimiento mínimas). Los anticuerpos anti-Tie2 de la invención también pueden administrarse en combinación con antivíricos, antibióticos, analgésicos, corticoesteroides y/o AINE. Los anticuerpos anti-Tie2 de la invención también pueden administrarse como parte de una pauta de tratamiento que también incluye tratamiento de radiación y/o quimioterapia convencional.

El componente o los componentes terapéuticamente activos adicionales pueden administrarse justo antes, simultáneamente o poco después de la administración de un anticuerpo anti-Tie2 de la presente invención; (para los fines de la presente divulgación, dichas pautas de administración se consideran la administración de un anticuerpo anti-Tie2 "en combinación con" un componente terapéuticamente activo adicional). La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo anti-Tie2 de la presente invención se formula conjuntamente con uno o más del componente o los componentes terapéuticamente activos adicionales que se describen en otra parte del presente documento.

**Usos diagnósticos de los anticuerpos**

Los anticuerpos anti-Tie2 de la presente invención también pueden usarse para detectar y/o medir Tie2 en una muestra, por ejemplo, con fines diagnósticos. Por ejemplo, un anticuerpo anti-Tie2 o un fragmento del mismo, puede usarse para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por una expresión aberrante (por ejemplo, sobreexpresión, expresión insuficiente, falta de expresión, etc.) de Tie2. Ensayos diagnósticos de ejemplo para Tie2 pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-Tie2 de la invención, en el que el anticuerpo anti-Tie2 está marcado con un marcador o una molécula indicadora detectables. Como alternativa, un anticuerpo anti-Tie2 no marcado puede usarse en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está el mismo marcado de forma detectable. El marcador o la molécula indicadora detectables pueden ser un radioisótopo, tal como $^{3}H$, $^{14}C$, $^{32}P$, $^{35}S$ o $^{125}I$; un resto fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Los ensayos de ejemplo específicos que pueden usarse para detectar o medir Tie2 en una muestra incluyen el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), el radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés).

Las muestras que pueden usarse en los ensayos de diagnóstico de Tie2 de la invención incluyen cualquier muestra de tejido o fluido obtenible de un paciente que contenga cantidades detectables de proteína Tie2 o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. En general, los niveles de Tie2 en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente que no padece una enfermedad o afección asociada a niveles o actividad anormales de Tie2) se medirán para establecer inicialmente un nivel basal, o de referencia, de Tie2. Este nivel basal de Tie2 puede compararse con los niveles de Tie2 medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una enfermedad o afección relacionada con Tie2.

**Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y una descripción completas de cómo hacer y usar los métodos y composiciones de la invención, y no tienen por objeto limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o está próxima a la atomosférica.

**Construcciones de control utilizadas en los siguientes ejemplos**

Se incluyó una construcción de control de ejemplo (anticuerpo anti-Tie2) en varios experimentos que se describen a continuación con fines comparativos. El anticuerpo, denominado Control I, es un anticuerpo quimérico anti-Tie2 con dominios variables de cadena pesada y ligera de ratón que tienen las secuencias de aminoácidos de los dominios correspondientes de "12H8", como se establece en la Patente de EE.UU. 6.376.653. El dominio constante de este anticuerpo es la IgG4 humana.

**Ejemplo 1. Generación de anticuerpos humanos contra Tie2 humana**

Se generaron varios anticuerpos anti-Tie2 humanos mediante la inmunización de un ratón VELOCIMMUNE® con antígeno Tie2 humano de acuerdo con métodos convencionales (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6596.541). Usando esta técnica, se obtuvieron varios anticuerpos antiTie2; se describen en detalle anticuerpos de ejemplo generados de esta manera y sus correspondientes características biológicas, en los siguientes ejemplos e incluyen los anticuerpos designados como H2aM2760N, H2aM2761N, H1M2055N, H1H2304B, H1H2317B, H1H2322B, H1H2324B, H1H2331B, H1H2332B, H1H2333S, H1H2337B, H1H2338B, H1H2339B, H1H2340B y H4H2055N. Los prefijos H1M, H2M, H1H, etc. en las designaciones de anticuerpos utilizadas en el presente documento indican la región Fc particular del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo "H2M" tiene un Fc de IgG2 de ratón, mientras que un anticuerpo "H1H" tiene un Fc de IgG1 humana. Como apreciará un experto habitual en la materia, una región Fc de un anticuerpo puede modificarse o reemplazarse con una región Fc diferente, pero los dominios variables (incluyendo las CDR) seguirán siendo los mismos.

Se depositaron hibridomas que producen los anticuerpos anti-Tie2 H1M2055N y H2aM2760N en los términos del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo) (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209 el 2 de diciembre de 2011, con los números de acceso PTA-12295 (H1M2055N) y PTA-12296 (H2aM2760N).

**Ejemplo 2. Afinidades de unión derivadas de resonancia de plasmón superficial y constantes cinéticas de anticuerpos anti-Tie2 monoclonales humanos**

Las afinidades de unión y constantes cinéticas de anticuerpos anti-Tie2 monoclonales humanos se determinaron mediante resonancia de plasmón superficial a 25 ºC y 37 ºC (Tablas 1-4). Las mediciones se realizaron en un instrumento Biacore 2000 o T200.

Para los anticuerpos con una región constante de ratón (designados como H1M o H2M), los anticuerpos se inmovilizaron en una superficie del sensor de Fc anti-ratón y se inyectaron diferentes concentraciones de construcciones de Tie2 de ratón, rata o humana (hTie2-His, mTie2-hFc y rTie2-hFc) sobre la superficie capturada del anticuerpo. Para los anticuerpos en el formato de IgG humana (designados como H1H o H4H), se empleó una superficie del sensor de anticuerpo anti-Fc humano (hTie2-His y hTie2-mFc) o una superficie del sensor de anticuerpo anti-Fab humano (mTie2-hFc y rTie2-hFc) dependiendo de la construcción Tie-2 aplicada a la superficie capturada del anticuerpo. Las secuencias de aminoácidos de las construcciones utilizadas en este Ejemplo son las siguientes: hTie2-His (SEQ ID NO: 2); hTie2-hFc (SEQ ID NO: 3); hTie2-mFc (SEQ ID NO: 4); rTie2-hFc (SEQ ID NO: 5); y mTie2-hFc (SEQ ID NO: 6).

Las constantes de velocidad cinética – velocidad de asociación (ka) y velocidad de disociación (kd) se determinaron mediante el ajuste de los diagramas de sensibilidad en tiempo real a un modelo de unión 1:1 con limitación de transporte de masa usando el software de ajuste de curvas Scrubber 2.0. La constante de disociación de equilibrio ($K_D$) y la semivida disociativa (T½) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética como: $K_D$ (M) = kd/ka; y T½ (min) = (ln2/(60*kd).). Como se muestra en las Tablas 1-2, varios anticuerpos demostraron una unión de alta afinidad a hTie2 a ambas temperaturas sometidas a ensayo. Además, H1M2055N, H1H2332B, H1H2337B, H1H2340B y H4H2055N presentaron una unión significativa a Tie2 de ratón y rata (Tablas 3-4).

**Tabla 1: Afinidades de unión de Biacore de mAb humanos contra hTie2 a 25 ºC**

| Unión a 25 º formato de captura de Mab | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Anticuerpo | Analito | ka ($Ms^{-1}$) | kd ($s^{-1}$) | $K_D$ (Molar) | T½ (min) |
| H2aM2760N | hTie2-His | 2,91E+04 | 1,84E-04 | 6,32E-09 | 63 |
| | hTie2-hFc | NE | NE | NE | NE |
| H2aM2761N | hTie2-His | 3,33E+04 | 1,01E-04 | 3,02E-09 | 115 |
| | hTie2-hFc | NE | NE | NE | NE |
| H1M2055N | hTie2-His | 5,75E+05 | 1,34E-04 | 2,33E-10 | 86 |
| | hTie2-hFc | NE | NE | NE | NE |
| H1H2304B | hTie2-His | 1,99E+05 | 1,32E-03 | 6,66E-09 | 9 |
| | hTie2-mFc | 5,80E+05 | 3,75E-05 | 6,46E-11 | 308 |

| Unión a 25 º formato de captura de Mab | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Anticuerpo | Analito | ka ($Ms^{-1}$) | kd ($s^{-1}$) | $K_D$ (Molar) | T½ (min) |
| H1H2317B | hTie2-His | 1,43E+05 | 9,26E-04 | 6,50E-09 | 12 |
| | hTie2-mFc | 3,90E+05 | 2,36E-05 | 6,10E-11 | 489 |
| H1H2322B | hTie2-His | 1,67E+05 | 9,76E-04 | 5,84E-09 | 12 |
| | hTie2-mFc | 4,80E+05 | 1,39E-05 | 2,90E-11 | 829 |
| H1H2324B | hTie2-His | 2,40E+05 | 9,25E-04 | 3,86E-09 | 12 |
| | hTie2-mFc | 6,30E+05 | 5,92E-05 | 9,39E-11 | 195 |
| H1H2331B | hTie2-His | 3,63E+04 | 1,17E-03 | 3,22E-08 | 10 |
| | hTie2-mFc | 8,20E+04 | 1,24E-04 | 1,52E-09 | 93 |
| H1H2332B | hTie2-His | 8,89E+04 | 2,23E-08 | 2,51E-08 | 5 |
| | hTie2-mFc | 1,25E+05 | 2,13E-04 | 1,1E-09 | 54 |
| H1H2333S | hTie2-His | 5,92E+04 | 3,09E-04 | 5,21E-09 | 37 |
| | hTie2-mFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2337B | hTie2-His | 6,47E+04 | 6,49E-04 | 1,00E-08 | 18 |
| | hTie2-mFc | 1,20E+05 | 1,11E-04 | 9,30E-10 | 104 |
| H1H2338B | hTie2-His | 4,93E+04 | 3,44E-04 | 6,99E-09 | 34 |
| | hTie2-mFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2339B | hTie2-His | 5,58E+04 | 1,25E-03 | 2,24E-08 | 9 |
| | hTie2-mFc | 1,51E+05 | 1,02E-04 | 6,70E-10 | 114 |
| H1H2340B | hTie2-His | 7,01E+04 | 3,45E-03 | 4,92E-08 | 3 |
| | hTie2-mFc | 1,65E+05 | 1,91E-04 | 1,16E-09 | 60 |
| H4H2055N | hTie2-His | 3,82E+05 | 4,84E-04 | 1,27E-09 | 24 |
| | hTie2-mFc | 1,27E+06 | 9,92E-05 | 7,80E-11 | 116 |
| Control I | hTie2-His | 6,53E+04 | 4,57E-04 | 7,00E-09 | 25 |
| | hTie2-mFc | 1,45E+05 | 1,16E-04 | 8,03E-10 | 99 |
| SU = sin unión en las condiciones sometidas a ensayo<br>NE = no sometido a ensayo | | | | | |

**Tabla 2: Afinidades de unión de Biacore de mAb humanos contra hTie2 a 37 ºC**

| Unión a 37 º formato de captura de Mab | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Anticuerpo | Analito | ka ($Ms^{-1}$) | kd ($s^{-1}$) | $K_D$ (Molar) | T½ (min) |
| H2aM2760N | hTie2-His | 4,04E+04 | 3,06E-04 | 7,60E-09 | 38 |
| | hTie2-hFc | NE | NE | NE | NE |
| H2aM2761N | hTie2-His | 4,26E+04 | 2,87E-04 | 6,74E-09 | 40 |
| | hTie2-hFc | NE | NE | NE | NE |
| H1M2055N | hTie2-His | 1,08E+06 | 3,36E-04 | 3,10E-10 | 34 |
| | hTie2-hFc | NE | NE | NE | NE |
| H1H2304B | hTie2-His | 3,50E+05 | 3,67E-03 | 1,05E-08 | 3 |
| | hTie2-mFc | 6,60E+05 | 1,30E-04 | 1,96E-10 | 89 |
| H1H2317B | hTie2-His | 1,74E+05 | 3,46E-03 | 1,98E-08 | 3 |
| | hTie2-mFc | 4,60E+05 | 9,94E-05 | 2,15E-10 | 116 |
| H1H2322B | hTie2-His | 2,12E+05 | 4,74E-08 | 2,74E-08 | 2 |
| | hTie2-mFc | 5,70E+05 | 9,72E-05 | 1,72E-10 | 119 |
| H1H2324B | hTie2-His | 2,78E+05 | 2,26E-03 | 8,12E-09 | 5 |
| | hTie2-mFc | 7,40E+05 | 1,47E-04 | 1,99E-10 | 79 |
| H1H2331B | hTie2-His | 5,48E+04 | 4,74E-03 | 8,65E-08 | 2 |
| | hTie2-mFc | 1,28E+05 | 1,99E-04 | 1,56E-09 | 58 |
| H1H2332B | hTie2-His | 9,58E+04 | 8,19E-03 | 8,55E-08 | 1 |
| | hTie2-mFc | 1,81E+05 | 6,52E-04 | 3,60E-09 | 18 |
| H1H2333S | hTie2-His | 6,20E+04 | 9,83E-04 | 1,58E-08 | 12 |
| | hTie2-mFc | SU | SU | SU | SU |

| Unión a 37 º formato de captura de Mab | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Anticuerpo | Analito | ka ($Ms^{-1}$) | kd ($s^{-1}$) | $K_D$ (Molar) | T½ (min) |
| H1H2337B | hTie2-His | 8,35E+04 | 2,41E-03 | 2,89E-08 | 5 |
| | hTie2-mFc | 1,92E+05 | 2,55E-04 | 1,33E-09 | 45 |
| H1H2338B | hTie2-His | 5,55E+04 | 9,93E-04 | 1,79E-08 | 12 |
| | hTie2-mFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2339B | hTie2-His | 6,78E+04 | 4,88E-03 | 7,20E-08 | 2 |
| | hTie2-mFc | 1,93E+0305 | 2,95E-04 | 1,53E-09 | 39 |
| H1H2340B | hTie2-His | 9,75E+04 | 9,98E-03 | 1,02E-07 | 1 |
| | hTie2-mFc | 2,00E+05 | 5,15E-04 | 2,58E-09 | 22 |
| H4H2055N | hTie2-His | 5,49E+05 | 04 | 8,01E-1,46E-09 | 14 |
| | hTie2-mFc | 1,67E+06 | 1,55E-04 | 9,30E-11 | 74 |
| Control I | hTie2-His | 7,48E-04 | 1,12E-03 | 1,49E-08 | 10 |
| | hTie2-mFc | 1,80E+05 | 1,70E-04 | 9,40E-10 | 68 |
| SU = sin unión en las condiciones sometidas a ensayo<br>NE = no sometido a ensayo | | | | | |

**Tabla 3: Afinidades de unión de Biacore de mAb humanos contra mTie2 a 25 ºC**

| Unión a 25 º formato de captura de Mab | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Anticuerpo | Analito | ka ($Ms^{-1}$) | kd ($s^{-1}$) | $K_D$ (Molar) | T½ (min) |
| H2aM2760N | mTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H2aM2761N | mTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1M2055N | mTie2-hFc | 1,07E+06 | 1,85E-05 | 1,73E-11 | 625 |
| H1H2304B | mTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2317B | mTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2322B | mTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2324B | mTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2331B | mTie2-hFc | 4,81E+04 | 2,72E-03 | 5,65E-08 | 4 |
| H1H2332B | mTie2-hFc | 5,39E+04 | 5,76E-03 | 1,07E-07 | 2 |
| H1H2333S | mTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2337B | mTie2-hFc | 1,87E+05 | 1,84E-02 | 9,83E-08 | 1 |
| H1H2338B | mTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2339B | mTie2-hFc | 4,68E+04 | 2,63E-03 | 5,63E-08 | 4 |
| H1H2340B | mTie2-hFc | 1,36E_05 | 6,72E-03 | 4,96E-08 | 2 |
| H4H2055N | mTie2-hFc | 1,24E+06 | 6,19E-06 | 5,01E-12 | 1867 |
| Control I | mTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| SU = sin unión en las condiciones sometidas a ensayo | | | | | |

**Tabla 4: Afinidades de unión de Biacore de mAb humanos contra rTie2 a 25 ºC**

| Unión a 25 º formato de captura de Mab | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Anticuerpo | Analito | ka ($Ms^{-1}$) | kd ($s^{-1}$) | $K_D$ (Molar) | T½ (min) |
| H2aM2760N | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H2aM2761N | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1M2055N | rTie2-hFc | 9,43E+05 | 2,55E-05 | 2,70E-11 | 454 |
| H1H2304B | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2317B | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2322B | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2324B | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2331B | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2332B | rTie2-hFc | 1,12E+05 | 6,18E-03 | 5,53E-08 | 2 |
| H1H2333S | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2337B | rTie2-hFc | 1,45E+05 | 8,46E-03 | 5,85E-08 | 1 |
| H1H2338B | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |

| Unión a 25 º formato de captura de Mab | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Anticuerpo | Analito | ka ($Ms^{-1}$) | kd ($s^{-1}$) | $K_D$ (Molar) | T½ (min) |
| H1H2339B | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| H1H2340B | rTie2-hFc | 1,43E+05 | 3,71E-03 | 2,59E-08 | 3 |
| H4H2055N | rTie2-hFc | 1,07E+06 | 1,00E-06 | 9,31E-13 | 11550 |
| Control I | rTie2-hFc | SU | SU | SU | SU |
| SU = sin unión en las condiciones sometidas a ensayo | | | | | |

**Ejemplo 3. Cartografiado de epítopos de mAb contra Tie2 usando Perlas Luminex**

Para determinar la unión al dominio para los anticuerpos anti-Tie2, varias construcciones de supresión de dominio extracelular del receptor hTie2 se unieron covalentemente a perlas xMAP de luminex (10 µg/ml de cada proteína por $10^7$ cuentas). Las construcciones se representan en la Figura 1 y se designan como se indica a continuación: hTie2 (Ig1-Ig2-EGF) (SEQ ID NO: 7); hTie2 (Ig2-EGF) (SEQ ID NO: 8); hTie2 (EGF) (SEQ ID NO: 9); hTie2 (Ig3-FN) (SEQ ID NO: 10); y hTie2 (FN) (SEQ ID NO: 11). También se sometieron a ensayo en este Ejemplo las construcciones de ectodominio hTie2-mFc (SEQ ID NO: 4) y hTie1-hFc (SEQ ID NO: 12) de longitud completa.

Para la unión, se añadieron 25 µl de anticuerpo anti-Tie2 (25 µg/ml) a 75 µl de la mezcla de perlas Luminex creadas anteriormente ($3x10^3$ perlas por construcción) en tampón de unión (PBS, Tween 20 al 0,05 %, BSA 1 mg/ml, azida sódica al 0,05 %) en una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore). La incubación se realizó a temperatura ambiente (TA) durante 90 minutos o durante la noche a 4 ºC con agitación. Las perlas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (PBS + Tween 20 al 0,05 %) se resuspendieron en 100 µl de tampón de unión que contenía anticuerpo anti-kappa humano marcado con PE (ficoeritrina) o anticuerpo secundario anti Fab de ratón marcado con PE y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min con agitación. Las muestras se lavaron dos veces más y la señal de unión (IFM) para cada perla se determinó usando un instrumento Luminex L200 o FLEXMAP3D. Se usó Tie2 humana unida a perlas como control positivo y se usó Tie1 humana unida a perlas para medir la reactividad cruzada de la familia. En general, las señales de IFM mayores de 500 unidades representan una unión significativa. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5

| Anticuerpo | hTie2-mFc | hTie1-hFc | hTie2 (EGF) | hTie2 (Ig1, Ig2, EGF) | hTie2 (Ig2, EGF) | hTie2 (FN)-hFc | hTie2 (Ig3, FN)-hFc | Dominio de unión predicha |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| H2aM2760N | 1668 | 15 | 4 | 9392 | 6245 | 341 | 330 | Ig1, Ig2 |
| H2aM2761N | 8503 | 135 | 10205 | 11657 | 8568 | 3403 | 14509 | EGF, Ig3 |
| H1M2055N | 753 | 112 | 90 | 2022 | 873 | 43 | 40 | Ig1, Ig2 |
| H1H2304B | 4250 | 40 | 8901 | 8776 | 7648 | 5 | 6 | Repetición de EGF |
| H1H2317B | 4853 | 37 | 9611 | 8966 | 8325 | 9 | 11 | Repetición de EGF |
| H1H2322B | 4040 | 47 | 9901 | 9161 | 9167 | 10 | 13 | Repetición de EGF |
| H1H2324B | 4506 | 31 | 9773 | 9438 | 8686 | 7 | 10 | Repetición de EGF |
| H1H2331B | 5766 | 118 | 8 | 6 | 10 | 8097 | 6568 | Repetición de FN |
| H1H2332B | 4783 | 32 | 3 | 3 | 4 | 6711 | 6044 | Repetición de FN |
| H1H2333S | 1875 | 10 | 3 | 2 | 2 | 6 | 6 | ND |
| H1H2337B | 5208 | 48 | 9 | 7 | 9 | 6425 | 7368 | Repetición de FN |
| H1H2338B | 1385 | 9 | 4 | 5 | 5 | 6 | 8 | ND |
| H1H2339B | 2913 | 62 | 6 | 5 | 6 | 4529 | 3838 | Repetición de FN |
| H1H2340B | 3009 | 22 | 4 | 4 | 6 | 5149 | 4599 | Repetición de FN |
| Control I | 4901 | 7 | 3 | 4 | 5 | 6105 | 4554 | Repetición de FN |

ND = no determinado

A partir de los resultados anteriores, puede concluirse que H2aM2760N y H1M2055N se unen a los dominios Ig1/Ig2 de Tie2; H2aM2761N se une a los dominios EGF e Ig3 de Tie2; H1H2304B, H1H2317B, H1H2322B y H1H2324B se unen al dominio EGF de Tie2; y H1H2331B, H1H2332B, H1H2337B, H1H2339B, H1H2340B y Control I se unen al dominio FN de Tie2.

**Ejemplo 4. Cartografiado de epítopos de la unión de H4H2055N a Tie2 por intercambio H/D**

Se realizaron experimentos para definir con mayor precisión los restos de aminoácidos de Tie2 con los que interactúa H4H2055N. (H4H2055N es una versión de IgG4 totalmente humana del anticuerpo H1M2055N producido a partir del hibridoma PTA-12295). Para este fin se realizó el cartografiado del epítopo de intercambio H/D. Una descripción general del método de intercambio H/D se expone, por ejemplo, en Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2): 252-259; y Engen y Smith (2001) *Anal. Chem*. 73: 256A-265A.

Para cartografiar el epítopo o los epítopos de unión del anticuerpo H4H2055N sobre Tie2 a través del intercambio H/D, se usó una construcción recombinante que consiste en los dominios extracelulares de Ig1, Ig2 y EGF de Tie2 humana (hTie2 (Ig1-Ig2-EGF); SEQ ID NO: 7). El anticuerpo H4H2055N se unió covalentemente a las perlas de agarosa N-hidroxisuccinimida (NHS) (GE Lifescience).

En el experimento 'encendido-solución/apagado-perlas' (encendido-intercambio en la solución seguido de apagado-intercambio en las perlas), el ligando (hTie2 Ig1-Ig2-EGF) se deuteró durante 5 minutos o 10 minutos en tampón de PBS preparado con $D_2O$ y después se unió a las perlas de H4H2055N a través de una incubación de 2 minutos. Las perlas unidas a Tie2 se lavaron con tampón acuoso de PBS (preparado con $H_2O$) y se incubaron durante la mitad del encendido-tiempo de intercambio en tampón de PBS. Después del apagado-intercambio, el Tie2 unido se eluyó de las perlas con una solución de TFA de pH bajo y enfriada con hielo. El Tie2 eluido se digirió después con pepsina inmovilizada (Thermo Scientific) durante 5 min. Los péptidos resultantes se desalaron usando puntas de pipetas cromatográficas ZipTip® y se analizaron inmediatamente mediante espectrometría de masas (EM) con desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo UltrafleXtreme (MALDI-TOF).

En el experimento 'encendido-perlas/apagado-perlas' (encendido-intercambio en las perlas seguido de apagado-intercambio en las perlas), Tie2 se unió primero a perlas de H4H2055N y después se incubaron durante 5 min o 10 min en $D_2O$ para el encendido-intercambio. Las siguientes etapas (apagado-intercambio, digestión con pepsina y análisis por EM) se realizaron como se describe para el procedimiento "encendido-solución/apagado-perlas". Los valores del centroide o las relaciones promedio de masa a carga (m/z) de todos los péptidos detectados se calcularon y compararon entre estos dos conjuntos de experimentos.

Los resultados se resumen en la Tabla 6, que proporciona una comparación de los valores m/z del centroide para todos los péptidos identificados mediante EM con cromatografía líquida-desorción e ionización por láser asistida por matriz (CL-MALDI) después del intercambio H/D y el procedimiento de digestión péptica. Probablemente debido a los enlaces disulfuro, la cobertura de la secuencia de Tie2 detectada en un solo espectro MALDI-TOF es relativamente baja. Sin embargo, más de la mitad de los péptidos pépticos detectados proporcionaron valores de centroide similares para los protocolos tanto de encendido-solución/apagado-perlas como de encendido-perlas/apagado-perlas. Tres segmentos con los restos correspondientes 88-106, 139-152 y 166-175 tuvieron valores delta del centroide ≥ 0,20 m/z en ambos experimentos. Para los fines del presente Ejemplo, una diferencia positiva (Δ) de al menos 0,20 m/z en ambos experimentos indica aminoácidos protegidos por la unión del anticuerpo. Los segmentos que cumplen con este criterio se indican con texto en negrita y un asterisco (*) en la Tabla 6.

**Tabla 6: Unión de H4H2055N a Tie2**

| | **Experimento I 5 min encendido-/2,5 min apagado-intercambio** | | | **Experimento II 10 min encendido-/5 min apagado-intercambio** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Restos (de la SEQ ID NO: 7)** | **encendido-solución/apagado-perlas** | **encendido-perlas/apagado-perlas** | **Δ** | **encendido-solución/apagado-perlas** | **encendido-perlas/apagado-perlas** | **Δ** |
| 20-33 | 1568,70 | 1568,63 | 0,07 | 1568,63 | 1568,63 | 0,00 |
| 26-33 | 1036,17 | 1036,16 | 0,01 | 1036,27 | 1036,21 | 0,07 |
| 38 -50 | 1572,91 | 1572,93 | -0,02 | 1572,78 | 1572,98 | -0,20 |
| 39-50 | 1425,38 | 1425,39 | 0,00 | 1425,54 | 1425,45 | 0,08 |
| 42-53 | 1440,52 | 1440,44 | 0,09 | 1440,62 | 1440,52 | 0,10 |
| 42-58 | 2041,43 | 2041,42 | 0,01 | 2041,58 | 2041,41 | 0,17 |
| 78-87 | 1124,17 | 1124,15 | 0,03 | 1124,20 | 1124,14 | 0,07 |
| 88-95 | 1049,49 | 1049,46 | 0,02 | 1049,46 | 1049,54 | -0,08 |
| **88-101 *** | 1767,78 | 1767,51 | **0,27** | 1767,79 | 1767,57 | **0,22** |
| **88-102 *** | 188108 | 1880 66 | **0,42** | 1881,14 | 1880,69 | **0,45** |
| **93-101 *** | 1127,80 | 1127,57 | **0,24** | 1127,80 | 1127,61 | **0,19** |

| | Experimento I<br>5 min encendido-/2,5 min apagado-intercambio | | | Experimento II<br>10 min encendido-/5 min apagado-intercambio | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Restos (de la SEQ ID NO: 7)** | **encendido-solución/apagado-perlas** | **encendido-perlas/apagado-perlas** | **Δ** | **encendido-solución/apagado-perlas** | **encendido-perlas/apagado-perlas** | **Δ** |
| **93-102 *** | 1241,46 | 1240,83 | **0,63** | 1241,34 | 1240,83 | **0,51** |
| **96-102 *** | 850,54 | 850,22 | **0,32** | 850,55 | 850,25 | **0,30** |
| **96-106 *** | 1233,29 | 1232,66 | **0,64** | 1233,43 | 1232,65 | **0,78** |
| **139-151 *** | 151422 | 1513,16 | **1,06** | 1514,49 | 1513,21 | **1,28** |
| **139-152 *** | 1643,17 | 1642,02 | **1,16** | 1643,44 | 1642,06 | **1,38** |
| 152-165 | 1498,87 | 1498,73 | 0,14 | 1498,88 | 1498,77 | 0,11 |
| 152-166 | 1662,09 | 1662,01 | 0,07 | 1662,10 | 1662,08 | 0,02 |
| 153-165 | 1369,70 | 1369,64 | 0,06 | 1369,77 | 1369,66 | 0,11 |
| **166-175 *** | 1115,07 | 1114,59 | **0,47** | 1115,04 | 1114,65 | **0,39** |
| **167-175 *** | 951,73 | 951,30 | **0,42** | 951,74 | 951,33 | **0,41** |

Puesto que el fragmento de péptido (m/z de 1049,4) correspondiente a los restos 88-95 no mostró retención de deuterio (Δ = 0) después del apagado-intercambio, el primer segmento protegido (88-106) puede reducirse para incluir solamente los restos 96-106. Por tanto, las tres regiones 96-106, 139-152 y 166-175 de la SEQ ID NO: 7 se protegen del apagado-intercambio completo por la unión de H4H2055N a Tie2 después del encendido-intercambio.

El dominio Ig1 de Tie2 consiste en los aminoácidos 1-97 de la SEQ ID NO: 7; el dominio Ig2 de Tie 2 consiste en los aminoácidos 98-186 de la SEQ ID NO: 7; y el dominio de repetición de EGF consiste en los aminoácidos 187-321 de la SEQ ID NO: 7. Por tanto, la primera región de unión (aminoácidos 96-106 de la SEQ ID NO: 7) incluye los dos últimos aminoácidos del dominio Ig1 y los primeros 9 aminoácidos del dominio Ig2. Las regiones de unión segunda y tercera (aminoácidos 139-152 y 166-175 de la SEQ ID NO: 7) están ubicadas completamente dentro del dominio Ig2.

También debe tenerse en cuenta que las regiones de unión segunda y tercera (aminoácidos 139-152 y 166-175 de la SEQ ID NO: 7) se encuentran dentro de la región de aminoácidos de Tie 2 que entra en contacto directamente con su ligando afín, Angiopoietin-2, basándose en la estructura co-cristalina de Barton et al. (2006, *Nat Struct Mol Biol* 13 (6) 524-532). Por tanto, este ejemplo sugiere que el anticuerpo H4H2055N se une a un epítopo discontinuo principalmente dentro del dominio Ig2 del Tie2 humana (con uno o dos posibles contactos de aminoácidos dentro de la porción C terminal del dominio Ig1) y que la unión a estas regiones se correlaciona con la capacidad de H4H2055N para bloquear la interacción entre Tie2 y Ang2 como se ilustra en los Ejemplos 5 y 6 del presente documento.

**Ejemplo 5. Evaluación de la capacidad de los anticuerpos anti-Tie2 para bloquear la interacción entre Tie2 y angiopoyetinas**

Se sabe que Tie2 interactúa con las angiopoyetinas (Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4). Por tanto, se realizó un conjunto inicial de experimentos para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-Tie2 para bloquear la unión de Tie2 a Ang2. En este primer conjunto de experimentos, se utilizó un inmunoensayo de bloqueo cuantitativo. Brevemente, se premezclaron soluciones de ecto-Tie2 biotinilada 0,8 nM fusionado con a 6xHis (SEQ ID NO: 2) con un anticuerpo anti-Tie2 que variaba de ~50 nM a 0 nM en diluciones seriadas. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, la cantidad de Tie2-His unida a la placa recubierta con Bow-Ang2 se midió mediante un ELISA de tipo sándwich. Bow-Ang2 (SEQ ID NO: 13), una construcción de Ang2 que comprende el dominio Fc de hIgG1 flanqueado por un dominio FD de Ang2 en ambos extremos, se recubrió a 2 µg/ml en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se bloqueó con BSA. La biotina-Tie2-His unida a la placa se detectó usando estreptavidina conjugada con HRP y se desarrolló usando BD OptEIA™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Se registraron señales de $DO_{450}$ nm y los datos se analizaron usando GraphPad Prism para calcular los valores de $CI_{50}$. Los resultados se resumen en la Tabla 7. Las $CI_{50}$ se definieron como la cantidad de anticuerpo necesaria para reducir al 50 % la biotina-Tie2-His detectable con respecto al ligando Bow-Ang2 unido a la placa. En la Tabla 7, un anticuerpo se designa como un "potenciador" si la adición del anticuerpo aumenta la cantidad de Tie2-His unida a la superficie recubierta con Bow-Ang2 con respecto al control sin anticuerpo.

**Tabla 7: Valores de $CI_{50}$ para el bloqueo de Mab anti-Tie2 de hTie2 con respecto a Bow-Ang2 unido a la placa**

| Anticuerpo | Resultado en ELISA de bloqueo | Bloqueo de la unión a Bow-Ang2 $CI_{50}$ (M) |
|---|---|---|
| H2aM2760N | Potenciador | N/A |
| H2aM2761N | Potenciador | N/A |
| H1M2055N | Potenciador | N/A |
| H1H2304B | Potenciador | N/A |

| Anticuerpo | Resultado en ELISA de bloqueo | Bloqueo de la unión a Bow-Ang2 $CI_{50}$ (M) |
|---|---|---|
| H1H2317B | Potenciador | N/A |
| H1H2322B | Potenciador | N/A |
| H1H2324B | Potenciador | N/A |
| H1H2331B | Potenciador | N/A |
| H1H2332B | Potenciador | N/A |
| H1H2333S | Potenciador | N/A |
| H1H2337B | Potenciador | N/A |
| H1H2338B | Potenciador | N/A |
| H1H2339B | Bloqueador | 1,89E-10 |
| H1H2340B | Bloqueador | 1,03E-09 |
| H4H2055N | Bloqueador | 1,06E-09 |
| Control I | Potenciador | N/A |

Este primer conjunto de experimentos demuestra que los anticuerpos anti-Tie2 H1H2339B, H1H2340B y H4H2055N son capaces de bloquear la interacción entre Ang2 y Tie2 en un formato ELISA.

Se realizó un conjunto adicional de experimentos para evaluar la capacidad de H4H2055N para bloquear la unión de Tie2 a Ang2 y otros miembros de la familia de las angiopoyetinas (Ang1, Ang3 y Ang4). En este conjunto de experimentos, se empleó un biosensor Octet Red usando dos formatos experimentales. En el primer formato, se capturó hTie2.mFc (SEQ ID NO: 4; 10 µg/ml) o un control negativo en las puntas del sensor Octet anti-mFc durante 5 min. Las superficies de la punta del sensor capturadas se saturaron después con anticuerpo H4H2055N o Control I sumergiéndolos en pocillos que contenían 300 nM de anticuerpos monoclonales respectivos durante 10 min. Finalmente, las puntas de los sensores se colocaron en pocillos que contenían 100 nM de hAng1 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, n.º del catálogo 923-AN/CF; n.º de acceso Q5HYA0), hAng2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, n.º del catálogo 623-AN/CF; n.º de acceso O15123), mAng3 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, Cat 738-AN/CF; n.º de acceso Q9WVH6) o hAng4 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, n.º de catálogo 964-AN/CF; n.º de acceso Q9Y264) durante 5 min. Se controló la respuesta de unión en cada etapa del experimento y se representó la unión de diferentes angiopoyetinas a las superficies de los receptores saturados de anticuerpos monoclonales (Figura 2). Como se ilustra en la Figura 2, H4H2055N bloqueó la unión de las cuatro angiopoyetinas a la superficie de hTie2.mFc. El anticuerpo Control I no bloqueó la unión de ninguna de las angiopoyetinas a las superficies recubiertas con Tie2.

En el segundo formato de ensayo, se capturó hTie2.mFc (10 µg/ml) o control negativo en las puntas de los sensores Octet recubiertos con anti-mFc (5 min) y después se colocaron las puntas en diferentes pocillos que contenían 100 nM de angiopoyetina (hAng1, hAng2, mAng3 o hAng4) durante 10 min. Finalmente, las puntas del sensor se colocaron en pocillos que contenían 300 nM de H4H2055N o Control I (5 min). Al igual que en el formato 1, se controló la respuesta de unión en cada etapa y se representó la respuesta de unión (Figura 3). Este formato demostró que, a diferencia del Control I, la unión de H4H2055N se ve disminuida por las angiopoyetinas ya unidas en las superficies recubiertas con Tie2. Por tanto, H4H2055N compite con las angiopoyetinas (Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4) para unirse a Tie2.

**Ejemplo 6. Evaluación de la capacidad de los anticuerpos anti-Tie2 para bloquear la señalización de Tie2 mediada por angiopoyetina**

Para caracterizar adicionalmente los mAb anti-hTie2 de la invención, se exploró la capacidad de los anticuerpos para bloquear la actividad de la luciferasa inducida por Tie2. En resumen, las células HEK293 se transfectaron de manera estable con hTie2 y el 10 % superior de las células que expresaban Tie2 se aislaron mediante FACS. Estas células después se transdujeron con lentivirus indicador de luciferasa dependiente de un elemento de respuesta al suero (SER, por sus siglas en inglés) (SA Biosciences) y se aisló una población clonal (293-TIE2/SRE-Luc) con respuesta robusta a formas tetraméricas de angiopoyetina-1 (Bow-Ang1, SEQ ID NO: 14) y angiopoyetina-2 (Bow-Ang2, SEQ ID NO: 13).

Para los ensayos, se sembraron células 293-Tie2/SRE-Luc (30.000 células por pocillo) en placas de 96 pocillos un día antes del tratamiento. Se generaron curvas de dosis-respuesta con diluciones seriadas de Bow-Ang1 (BA1) o Bow-Ang2 (BA2) incubadas con células durante 4 h antes de medir la actividad de la luciferasa. Para la inhibición de Tie2, las células se trataron con mAb contra Tie2 diluidos en serie en presencia de una dosis constante 1 nM de BA1 o BA2 durante 4 h. La actividad de la luciferasa se midió en un luminómetro Victor después de la incubación con el reactivo One-Glo™ (Promega). Se observaron tres clases de anticuerpos: Bloqueadores, definidos como una reducción en la actividad luciferasa dependiente de Tie2 tras la adición de anticuerpo; Activadores, definidos como un aumento en la actividad luciferasa dependiente de Tie2 tras la adición de anticuerpo; y No activos, definidos como ningún cambio significativo en la señal tras su adición. Para los anticuerpos "no activos", no se calculó ningún valor de $CE_{50}$ o $CI_{50}$. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

**Tabla 8: Valores de $CI_{50}$ para anticuerpos anti-Tie2**

| Anticuerpos | Clase de Mab (BowAng1) | $CE_{50}$ o $CI_{50}$ ± ETM ($10^{-9}$ M) BowAng1 | Clase de Mab (BowAng2) | $CE_{50}$ o $CI_{50}$ ± ETM ($10^{-9}$ M) BowAng2 |
|---|---|---|---|---|
| H2aM2760N | Bloqueador | 11,6 ± 0,81 | Bloqueador | 2,8 ± 0,14 |
| H2aM2761N | Bloqueador, no hasta el valor basal | 5,2 ± 1,3 | Bloqueador, no hasta el valor basal | 1,1 ± 0,11 |
| H4H2055N | Bloqueador | 0,69 ± 0,16 | Bloqueador | 0,23 ± 0,03 |
| H1H2304B | Sin actividad | NA | Sin actividad | NA |
| H1H2317B | Sin actividad | NA | Sin actividad | NA |
| H1H2322B | Sin actividad | NA | Sin actividad | NA |
| H1H2324B | Sin actividad | NA | Sin actividad | NA |
| H1H2331B | Activador | 13,6 ± 3,1 | Activador | 5,1 ± 1,9 |
| H1H2332B | Activador | 2,5 ± 1,2 | Activador | 3,7 ± 0,15 |
| H1H2333B | Sin actividad | NA | Sin actividad | NA |
| H1H2337B | Activador | 1,1 ± 0,02 | Activador | 4,7 ± 0,80 |
| H1H2338B | Sin actividad | NA | Sin actividad | NA |
| H1H2339B | Activador | 10,3 ± 0,23 | Activador | 13,0 ± 3,5 |
| HIH2340B | Activador | 1,41 ± 0,01 | Activador | 2,1 ± 0,04 |
| Control I | Activador | 0,76 ± 0,50 | Activador | 1,4 ± 0,03 |
| Los valores de $CI_{50}$ se publican para los Bloqueadores y los valores de $CE_{50}$ se publican para los Activadores | | | | |

Los anticuerpos anti-Tie2 H2aM2760N, H2aM2761N y H4H2055N se identificaron como bloqueadores en este sistema experimental.

**Ejemplo 7. Evaluación de la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-Tie2 *in vivo***

Se sometió a ensayo un anticuerpo anti-Tie2 de ejemplo (H2M2055N) para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos. Brevemente, se cultivaron tumores HT29 o Colo205 colorrectales humanos en ratones SCID. Cuando los tumores fueron palpables (100 $mm^3$ para HT29 y 400 $mm^3$ para Colo205), los animales se trataron cada dos semanas con proteína Fc (10 mg/kg) o anticuerpo anti-Tie2 (H1M2055N; 10 mg/kg). Al final del tratamiento (31 días para HT29 y 14 días para Colo205), se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) (Tabla 9) y se recogió tejido tumoral y se utilizó para el análisis de densidad de vasos. La densidad vascular se evaluó en secciones de tumor de TCO de 30 µm de espesor mediante inmunohistoquímica CD31. Se utilizó el software NIH Image para determinar el % de densidad de vasos de área en las secciones de tejido tumoral. Los resultados se ilustran gráficamente en las Figuras 4-7.

**Tabla 9: Porcentaje de disminución en el crecimiento tumoral con tratamiento con Mab anti-Tie2**

| | HT29 | | Colo205 | |
|---|---|---|---|---|
| Anticuerpo | Crecimiento tumoral promedio (mm3) desde el inicio del tratamiento | % de disminución en el crecimiento | Crecimiento tumoral promedio (mm3) desde el inicio del tratamiento | % de disminución en el crecimiento |
| Proteína Fc (10 mg/kg) | 100 | | 400 | |
| H2M2055N (10 mg/kg) | 100 | 27,5 | 400 | 77 |

Como se muestra en este Ejemplo, el Ab anti-Tie2, H1M2055N, no solo disminuyó el crecimiento tumoral (Tabla 9), sino que también disminuyó significativamente la densidad de vasos en los modelos de xenoinjerto tanto HT29 (25 %, Figura 5) como Colo205 (40 %, Figura 7).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Anticuerpos anti-Tie2 y usos de los mismos

<130> 7100A-WO

<140> A asignar
<141> Presentado con la presente

<150> 61/525.308
<151> 19-08-2011

<150> 61/587.213
<151> 17-01-2012

<150> 61/674.405
<151> 23-07-2012

<160> 18

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 1124
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

195 200 205
Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys
210 215 220
Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
225 230 235 240
Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu
245 250 255
Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu
260 265 270
Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser
275 280 285
Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro
290 295 300
Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
305 310 315 320
Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln
325 330 335
Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile
340 345 350
Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro
355 360 365
Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr
370 375 380
Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His
385 390 395 400
Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro
405 410 415
Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met
420 425 430
Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu
435 440 445
Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn
450 455 460
Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys
465 470 475 480
Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln
485 490 495
Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu
500 505 510
Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly
515 520 525
His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro
530 535 540
Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn
545 550 555 560
Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val
565 570 575
Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys
580 585 590
Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg
595 600 605
Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu
610 615 620
Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro
625 630 635 640
Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val
645 650 655
Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile

660 665 670
Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys
675 680 685
Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro
690 695 700
Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser
705 710 715 720
Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln
725 730 735
Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu
740 745 750
Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile
755 760 765
Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala
770 775 780
Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr
785 790 795 800
Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr
805 810 815
Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu
820 825 830
Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu
835 840 845
Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp
850 855 860
Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly
865 870 875 880
His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly
885 890 895
Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp
900 905 910
Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile
915 920 925
Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser His His Leu Leu His Phe
930 935 940
Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe
945 950 955 960
Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr
965 970 975
Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr
980 985 990
Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu
995 1000 1005
Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser Tyr
1010 1015 1020
Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro Tyr Cys
1025 1030 1035 1040
Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln Gly Tyr Arg
1045 1050 1055
Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr Asp Leu Met Arg
1060 1065 1070
Gln Cys Trp Arg Glu Lys Pro Tyr Glu Arg Pro Ser Phe Ala Gln Ile
1075 1080 1085
Leu Val Ser Leu Asn Arg Met Leu Glu Glu Arg Lys Thr Tyr Val Asn
1090 1095 1100
Thr Thr Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Tyr Ala Gly Ile Asp Cys Ser Ala
1105 1110 1115 1120
Glu Glu Ala Ala

<210> 2

<211> 735
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 2

```
Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu
 1               5                  10                  15
Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly Trp Arg
            20                  25                  30
Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu Met Asn
        35                  40                  45
Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg Glu Trp
    50                  55                  60
Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile Asn Gly
65                  70                  75                  80
Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg Ile Arg
                85                  90                  95
Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr
            100                 105                 110
Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys Lys Val
        115                 120                 125
Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser Phe Ile
    130                 135                 140
His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu
145                 150                 155                 160
Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile
                165                 170                 175
Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg
            180                 185                 190
Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys Thr Ala
        195                 200                 205
Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys Ile Cys
    210                 215                 220
Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His
225                 230                 235                 240
Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys
                245                 250                 255
Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala
            260                 265                 270
Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro Gly Phe
        275                 280                 285
Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly Glu Met
    290                 295                 300
Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu
305                 310                 315                 320
Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile Val Asp
                325                 330                 335
Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro Ile Cys
            340                 345                 350
Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr Leu Val
        355                 360                 365
```

Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His Thr Asp
370 375 380
His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro Pro Asp
385 390 395 400
Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met Val Glu
405 410 415
Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu Asn Ala
420 425 430
Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn Ile Ser
435 440 445
Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys Leu Leu
450 455 460
Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln Val Thr
465 470 475 480
Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu Tyr Glu
485 490 495
Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly His Pro
500 505 510
Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro Pro Pro
515 520 525
Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn Leu Thr
530 535 540
Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val Glu Val
545 550 555 560
Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys Val Pro
565 570 575
Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg Glu Gln
580 585 590
Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu Trp Ser
595 600 605
Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro Gln Pro
610 615 620
Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val Ile Ser
625 630 635 640
Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile Arg Tyr
645 650 655
Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys Ile Lys
660 665 670
Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro Glu Thr
675 680 685
Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser Ser Asn
690 695 700
Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln Ala Pro
705 710 715 720
Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Ile Asp His His His His His His
725 730 735

<210> 3
<211> 958
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 3

Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val Ser Asp Ala

1 5 10 15
Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly Trp Arg Pro His Glu Pro
20 25 30
Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu Met Asn Gln His Gln Asp
35 40 45
Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg Glu Trp Ala Lys Lys Val
50 55 60
Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile Asn Gly Ala Tyr Phe Cys
65 70 75 80
Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg Ile Arg Thr Met Lys Met
85 90 95
Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp
100 105 110
Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu
115 120 125
Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser Phe Ile His Ser Val Pro
130 135 140
Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His Ala Gln
145 150 155 160
Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu
165 170 175
Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln
180 185 190
Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys Thr Ala Cys Met Asn Asn
195 200 205
Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe
210 215 220
Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr Phe Gly Arg
225 230 235 240
Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val
245 250 255
Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys
260 265 270
Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Asp
275 280 285
Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly Glu Met Cys Asp Arg Phe
290 295 300
Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu Gln Cys Glu Arg
305 310 315 320
Glu Gly Ile Gln Arg Met Thr Pro Lys Ile Val Asp Leu Pro Asp His
325 330 335
Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro Ile Cys Lys Ala Ser Gly
340 345 350
Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr Leu Val Lys Pro Asp Gly
355 360 365
Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His Thr Asp His Phe Ser Val
370 375 380
Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro Pro Asp Ser Gly Val Trp
385 390 395 400
Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met Val Glu Lys Pro Phe Asn
405 410 415
Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu Asn Ala Pro Asn Val Ile
420 425 430
Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn Ile Ser Ser Glu Pro Tyr
435 440 445
Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys Leu Leu Tyr Lys Pro Val
450 455 460
Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln Val Thr Asn Glu Ile Val

465 470 475 480
Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu Tyr Glu Leu Cys Val Gln
485 490 495
Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly His Pro Gly Pro Val Arg
500 505 510
Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro Pro Pro Arg Gly Leu Asn
515 520 525
Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn Leu Thr Trp Gln Pro Ile
530 535 540
Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val Glu Val Glu Arg Arg Ser
545 550 555 560
Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys Val Pro Gly Asn Leu Thr
565 570 575
Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg Glu Gln Tyr Val Val Arg
580 585 590
Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu Trp Ser Glu Asp Leu Thr
595 600 605
Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro Gln Pro Glu Asn Ile Lys
610 615 620
Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val Ile Ser Trp Thr Ile Leu
625 630 635 640
Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile Arg Tyr Lys Val Gln Gly
645 650 655
Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys Ile Lys Asn Ala Thr Ile
660 665 670
Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro Glu Thr Ala Tyr Gln Val
675 680 685
Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser Ser Asn Pro Ala Phe Ser
690 695 700
His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln Ala Pro Ala Asp Leu Gly
705 710 715 720
Gly Gly Lys Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
725 730 735
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
740 745 750
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
755 760 765
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
770 775 780
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
785 790 795 800
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
805 810 815
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
820 825 830
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
835 840 845
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
850 855 860
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
865 870 875 880
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
885 890 895
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
900 905 910
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
915 920 925
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

930 935 940
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
945 950 955

<210> 4
<211> 981
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 4

Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu
20 25 30
Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly
35 40 45
Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu
50 55 60
Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
65 70 75 80
Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile
85 90 95
Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg
100 105 110
Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr
115 120 125
Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys
130 135 140
Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
145 150 155 160
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val
165 170 175
His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg
180 185 190
Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val
195 200 205
Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys
210 215 220
Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
225 230 235 240
Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu
245 250 255
Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu
260 265 270
Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser
275 280 285
Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro
290 295 300
Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
305 310 315 320
Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln
325 330 335
Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile
340 345 350

Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro
355 360 365
Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr
370 375 380
Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His
385 390 395 400
Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro
405 410 415
Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met
420 425 430
Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu
435 440 445
Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn
450 455 460
Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys
465 470 475 480
Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln
485 490 495
Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu
500 505 510
Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly
515 520 525
His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro
530 535 540
Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn
545 550 555 560
Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val
565 570 575
Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys
580 585 590
Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg
595 600 605
Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu
610 615 620
Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro
625 630 635 640
Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val
645 650 655
Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile
660 665 670
Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys
675 680 685
Ile Lys Asn Ala Thr Ile Ile Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro
690 695 700
Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser
705 710 715 720
Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln
725 730 735
Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Gly Pro Gly Glu Pro Arg Gly
740 745 750
Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu
755 760 765
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val
770 775 780
Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
785 790 795 800
Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
805 810 815

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
820 825 830
Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
835 840 845
Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala
850 855 860
Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro
865 870 875 880
Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln
885 890 895
Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr
900 905 910
Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
915 920 925
Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu
930 935 940
Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser
945 950 955 960
Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser
965 970 975
Arg Thr Pro Gly Lys
980

<210> 5
<211> 957
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 5

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

195 200 205
Lys Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys Ile Cys Pro
210 215 220
Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Pro His Thr
225 230 235 240
Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Ser Glu Gly Cys Lys
245 250 255
Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr
260 265 270
Gly Trp Arg Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys Pro Tyr Gly His Tyr
275 280 285
Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys His Cys Thr Asn Glu Glu Met Cys
290 295 300
Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Gln Gly Trp Gln Gly Leu Gln
305 310 315 320
Cys Glu Lys Glu Gly Arg Pro Arg Met Thr Pro Gln Ile Glu Asp Leu
325 330 335
Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro Ile Cys Lys
340 345 350
Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Ser Glu Glu Met Thr Leu Val Lys
355 360 365
Pro Asp Gly Thr Val Leu Gln Pro Asn Asp Phe Asn His Thr Asp His
370 375 380
Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Val Asn Arg Ile Leu Pro Pro Asp Ser
385 390 395 400
Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met Val Glu Lys
405 410 415
Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Glu Pro Leu His Ala Pro
420 425 430
Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Ile Ile Asn Ile Ser Ser
435 440 445
Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys Leu Phe Tyr
450 455 460
Lys Pro Val Asn Gln Ala Trp Lys Tyr Ile Gln Val Met Asn Glu Ile
465 470 475 480
Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Asp Tyr Glu Leu Cys Val
485 490 495
Gln Leu Val Arg Pro Gly Glu Gly Gly Glu Gly His Pro Gly Pro Val
500 505 510
Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro Pro Pro Arg Gly Leu
515 520 525
Ser Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Ala Leu Asn Leu Thr Trp Gln Pro
530 535 540
Ile Phe Thr Ser Ser Glu Asp Glu Phe Tyr Val Glu Val Glu Arg Trp
545 550 555 560
Ser Gln Gln Thr Arg Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys Val Pro Gly Asn
565 570 575
Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu Leu Pro Arg Glu Gln Tyr Ser
580 585 590
Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu Trp Ser Glu Glu
595 600 605
Leu Arg Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro Gln Pro Glu Asn
610 615 620
Ile Lys Ile Thr Asn Ile Thr Asp Tyr Thr Ala Leu Val Ser Trp Thr
625 630 635 640
Ile Val Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Ile Ile Arg Tyr Lys Val
645 650 655
Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Ile Asp Val Lys Ile Lys Asn Ala

660 665 670
Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro Glu Thr Thr Tyr
675 680 685
His Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser Ser Asn Pro Ala
690 695 700
Phe Ser Gln Glu Ile Arg Thr Leu Pro Ala Pro Lys Asp Leu Gly Gly
705 710 715 720
Gly Lys Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
725 730 735
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
740 745 750
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
755 760 765
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
770 775 780
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
785 790 795 800
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
805 810 815
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
820 825 830
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
835 840 845
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
850 855 860
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
865 870 875 880
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
885 890 895
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
900 905 910
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
915 920 925
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
930 935 940
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
945 950 955

<210> 6
<211> 957
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 6

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

Glu Gly Arg Val Arg Gly Gln Ala Ile Arg Ile Arg Thr Met Lys Met
85 90 95
Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp
100 105 110
Arg Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu
115 120 125
Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser Phe Ile His Ser Val Pro
130 135 140
Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His Ala Gln
145 150 155 160
Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu
165 170 175
Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln
180 185 190
Lys Trp Gly Pro Asp Cys Ser Arg Pro Cys Thr Thr Cys Lys Asn Asn
195 200 205
Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe
210 215 220
Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Pro His Thr Phe Gly Arg
225 230 235 240
Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Pro Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val
245 250 255
Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Arg
260 265 270
Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Pro Asp
275 280 285
Cys Lys Leu Arg Cys His Cys Thr Asn Glu Glu Ile Cys Asp Arg Phe
290 295 300
Gln Gly Cys Leu Cys Ser Gln Gly Trp Gln Gly Leu Gln Cys Glu Lys
305 310 315 320
Glu Gly Arg Pro Arg Met Thr Pro Gln Ile Glu Asp Leu Pro Asp His
325 330 335
Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro Ile Cys Lys Ala Ser Gly
340 345 350
Trp Pro Leu Pro Thr Ser Glu Glu Met Thr Leu Val Lys Pro Asp Gly
355 360 365
Thr Val Leu Gln Pro Asn Asp Phe Asn Tyr Thr Asp Arg Phe Ser Val
370 375 380
Ala Ile Phe Thr Val Asn Arg Val Leu Pro Pro Asp Ser Gly Val Trp
385 390 395 400
Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met Val Glu Lys Pro Phe Asn
405 410 415
Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Glu Pro Leu His Ala Pro Asn Val Ile
420 425 430
Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Ile Ile Asn Ile Ser Ser Glu Pro Tyr
435 440 445
Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys Leu Phe Tyr Lys Pro Val
450 455 460
Asn Gln Ala Trp Lys Tyr Ile Glu Val Thr Asn Glu Ile Phe Thr Leu
465 470 475 480
Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Asp Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Ala
485 490 495
Arg Pro Gly Glu Gly Gly Glu Gly His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe
500 505 510
Thr Thr Ala Cys Ile Gly Leu Pro Pro Pro Arg Gly Leu Ser Leu Leu
515 520 525
Pro Lys Ser Gln Thr Ala Leu Asn Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Thr
530 535 540

Asn Ser Glu Asp Glu Phe Tyr Val Glu Val Glu Arg Arg Ser Leu Gln
545 550 555 560
Thr Thr Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser
565 570 575
Val Leu Leu Ser Asn Leu Val Pro Arg Glu Gln Tyr Thr Val Arg Ala
580 585 590
Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu Trp Ser Glu Glu Leu Arg Ala
595 600 605
Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile
610 615 620
Ser Asn Ile Thr Asp Ser Thr Ala Met Val Ser Trp Thr Ile Val Asp
625 630 635 640
Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Ile Ile Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys
645 650 655
Asn Glu Asp Gln His Ile Asp Val Lys Ile Lys Asn Ala Thr Val Thr
660 665 670
Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro Glu Thr Thr Tyr His Val Asp
675 680 685
Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser Ser Asn Pro Ala Phe Ser His
690 695 700
Glu Leu Arg Thr Leu Pro His Ser Pro Gly Ser Ala Asp Leu Gly Gly
705 710 715 720
Gly Lys Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
725 730 735
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
740 745 750
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
755 760 765
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
770 775 780
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
785 790 795 800
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
805 810 815
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
820 825 830
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
835 840 845
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
850 855 860
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
865 870 875 880
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
885 890 895
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
900 905 910
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
915 920 925
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
930 935 940
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
945 950 955

<210> 7
<211> 321
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 7

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

<210> 8
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 8

```
Met Ala Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp
 1               5                  10                  15
Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu
            20                  25                  30
Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser Phe Ile His Ser Val Pro
        35                  40                  45
Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His Ala Gln
    50                  55                  60
Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu
65                  70                  75                  80
Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln
                85                  90                  95
Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys Thr Ala Cys Met Asn Asn
            100                 105                 110
Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe
        115                 120                 125
Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr Phe Gly Arg
    130                 135                 140
Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val
145                 150                 155                 160
Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys
                165                 170                 175
Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Asp
            180                 185                 190
Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly Glu Met Cys Asp Arg Phe
        195                 200                 205
Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu Gln Cys Glu Arg
    210                 215                 220
Glu Gly
225
```

<210> 9
<211> 140
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 9

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

            130                 135                 140
```

<210> 10
<211> 381
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 10

```
Pro Lys Ile Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys
 1               5                  10                  15
Phe Asn Pro Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu
            20                  25                  30
Glu Met Thr Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp
        35                  40                  45
Phe Asn His Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg
    50                  55                  60
Ile Leu Pro Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val
65                  70                  75                  80
Ala Gly Met Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro
                85                  90                  95
Lys Pro Leu Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala
            100                 105                 110
Val Ile Asn Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys
        115                 120                 125
Ser Lys Lys Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln
    130                 135                 140
His Ile Gln Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro
145                 150                 155                 160
Arg Thr Glu Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly
                165                 170                 175
Gly Glu Gly His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile
            180                 185                 190
Gly Leu Pro Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr
        195                 200                 205
Thr Leu Asn Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp
    210                 215                 220
Phe Tyr Val Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln
225                 230                 235                 240
Asn Ile Lys Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu
                245                 250                 255
His Pro Arg Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala
            260                 265                 270
Gln Gly Glu Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile
        275                 280                 285
Leu Pro Pro Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser
    290                 295                 300
Ser Ala Val Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser
305                 310                 315                 320
Ile Thr Ile Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val
                325                 330                 335
Asp Val Lys Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly
            340                 345                 350
Leu Glu Pro Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn
        355                 360                 365

Ile Gly Ser Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val
    370                 375                 380
```

<210> 11
<211> 286

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 11

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

<210> 12
<211> 995
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 12

Met Val Trp Arg Val Pro Pro Phe Leu Leu Pro Ile Leu Phe Leu Ala
1 5 10 15
Ser His Val Gly Ala Ala Val Asp Leu Thr Leu Leu Ala Asn Leu Arg
20 25 30
Leu Thr Asp Pro Gln Arg Phe Phe Leu Thr Cys Val Ser Gly Glu Ala
35 40 45
Gly Ala Gly Arg Gly Ser Asp Ala Trp Gly Pro Pro Leu Leu Leu Glu
50 55 60
Lys Asp Asp Arg Ile Val Arg Thr Pro Pro Gly Pro Pro Leu Arg Leu
65 70 75 80
Ala Arg Asn Gly Ser His Gln Val Thr Leu Arg Gly Phe Ser Lys Pro
85 90 95
Ser Asp Leu Val Gly Val Phe Ser Cys Val Gly Gly Ala Gly Ala Arg
100 105 110
Arg Thr Arg Val Ile Tyr Val His Asn Ser Pro Gly Ala His Leu Leu
115 120 125
Pro Asp Lys Val Thr His Thr Val Asn Lys Gly Asp Thr Ala Val Leu
130 135 140
Ser Ala Arg Val His Lys Glu Lys Gln Thr Asp Val Ile Trp Lys Ser
145 150 155 160
Asn Gly Ser Tyr Phe Tyr Thr Leu Asp Trp His Glu Ala Gln Asp Gly
165 170 175
Arg Phe Leu Leu Gln Leu Pro Asn Val Gln Pro Pro Ser Ser Gly Ile
180 185 190
Tyr Ser Ala Thr Tyr Leu Glu Ala Ser Pro Leu Gly Ser Ala Phe Phe
195 200 205
Arg Leu Ile Val Arg Gly Cys Gly Ala Gly Arg Trp Gly Pro Gly Cys
210 215 220
Thr Lys Glu Cys Pro Gly Cys Leu His Gly Gly Val Cys His Asp His
225 230 235 240
Asp Gly Glu Cys Val Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Thr Arg Cys Glu
245 250 255
Gln Ala Cys Arg Glu Gly Arg Phe Gly Gln Ser Cys Gln Glu Gln Cys
260 265 270
Pro Gly Ile Ser Gly Cys Arg Gly Leu Thr Phe Cys Leu Pro Asp Pro
275 280 285
Tyr Gly Cys Ser Cys Gly Ser Gly Trp Arg Gly Ser Gln Cys Gln Glu
290 295 300
Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Ala Asp Cys Arg Leu Gln Cys Gln
305 310 315 320
Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Asp Arg Phe Ser Gly Cys Val Cys Pro
325 330 335
Ser Gly Trp His Gly Val His Cys Glu Lys Ser Asp Arg Ile Pro Gln
340 345 350
Ile Leu Asn Met Ala Ser Glu Leu Glu Phe Asn Leu Glu Thr Met Pro
355 360 365
Arg Ile Asn Cys Ala Ala Ala Gly Asn Pro Phe Pro Val Arg Gly Ser
370 375 380
Ile Glu Leu Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu Leu Ser Thr Lys Ala
385 390 395 400
Ile Val Glu Pro Glu Lys Thr Thr Ala Glu Phe Glu Val Pro Arg Leu
405 410 415
Val Leu Ala Asp Ser Gly Phe Trp Glu Cys Arg Val Ser Thr Ser Gly
420 425 430
Gly Gln Asp Ser Arg Arg Phe Lys Val Asn Val Lys Val Pro Pro Val
435 440 445

Pro Leu Ala Ala Pro Arg Leu Leu Thr Lys Gln Ser Arg Gln Leu Val
450 455 460
Val Ser Pro Leu Val Ser Phe Ser Gly Asp Gly Pro Ile Ser Thr Val
465 470 475 480
Arg Leu His Tyr Arg Pro Gln Asp Ser Thr Met Asp Trp Ser Thr Ile
485 490 495
Val Val Asp Pro Ser Glu Asn Val Thr Leu Met Asn Leu Arg Pro Lys
500 505 510
Thr Gly Tyr Ser Val Arg Val Gln Leu Ser Arg Pro Gly Glu Gly Gly
515 520 525
Glu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Thr Leu Met Thr Thr Asp Cys Pro Glu
530 535 540
Pro Leu Leu Gln Pro Trp Leu Glu Gly Trp His Val Glu Gly Thr Asp
545 550 555 560
Arg Leu Arg Val Ser Trp Ser Leu Pro Leu Val Pro Gly Pro Leu Val
565 570 575
Gly Asp Gly Phe Leu Leu Arg Leu Trp Asp Gly Thr Arg Gly Gln Glu
580 585 590
Arg Arg Glu Asn Val Ser Ser Pro Gln Ala Arg Thr Ala Leu Leu Thr
595 600 605
Gly Leu Thr Pro Gly Thr His Tyr Gln Leu Asp Val Gln Leu Tyr His
610 615 620
Cys Thr Leu Leu Gly Pro Ala Ser Pro Pro Ala His Val Leu Leu Pro
625 630 635 640
Pro Ser Gly Pro Pro Ala Pro Arg His Leu His Ala Gln Ala Leu Ser
645 650 655
Asp Ser Glu Ile Gln Leu Thr Trp Lys His Pro Glu Ala Leu Pro Gly
660 665 670
Pro Ile Ser Lys Tyr Val Val Glu Val Gln Val Ala Gly Gly Ala Gly
675 680 685
Asp Pro Leu Trp Ile Asp Val Asp Arg Pro Glu Glu Thr Ser Thr Ile
690 695 700
Ile Arg Gly Leu Asn Ala Ser Thr Arg Tyr Leu Phe Arg Met Arg Ala
705 710 715 720
Ser Ile Gln Gly Leu Gly Asp Trp Ser Asn Thr Val Glu Glu Ser Thr
725 730 735
Leu Gly Asn Gly Leu Gln Ala Glu Gly Pro Val Gln Glu Ser Arg Ala
740 745 750
Ala Glu Glu Gly Leu Asp Gln Gln Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys
755 760 765
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
770 775 780
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
785 790 795 800
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
805 810 815
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
820 825 830
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
835 840 845
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
850 855 860
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
865 870 875 880
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
885 890 895
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
900 905 910

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
915 920 925
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
930 935 940
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
945 950 955 960
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
965 970 975
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
980 985 990
Pro Gly Lys
995

<210> 13
<211> 657
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 13

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

275 280 285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Asp Cys Ala Glu Val
435 440 445
Phe Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro
450 455 460
Asn Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly
465 470 475 480
Gly Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe
485 490 495
Gln Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly
500 505 510
Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln
515 520 525
Arg Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala
530 535 540
Tyr Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr
545 550 555 560
Arg Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser
565 570 575
Ile Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp
580 585 590
Lys Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe
595 600 605
Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg
610 615 620
Gln Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly
625 630 635 640
Ser Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp
645 650 655
Phe

<210> 14
<211> 674
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 14

Arg Asp Cys Ala Asp Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile
1 5 10 15
Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys
20 25 30
Asn Met Asp Val Asn Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu
35 40 45
Asp Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly
50 55 60
Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe
65 70 75 80
Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp
85 90 95
Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly
100 105 110
Asn Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr
115 120 125
Ala Gly Lys Gln Ser Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr
130 135 140
Lys Asp Ala Asp Asn Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu
145 150 155 160
Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly
165 170 175
Met Phe Tyr Thr Ala Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys
180 185 190
Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met
195 200 205
Met Ile Arg Pro Leu Asp Phe Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
450 455 460
Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
465 470 475 480
Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
485 490 495
Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
500 505 510
Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
515 520 525
Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
530 535 540
Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
545 550 555 560
Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
565 570 575
Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
580 585 590
Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
595 600 605
Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
610 615 620
Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala
625 630 635 640
Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
645 650 655
Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
660 665 670
Asp Phe

<210> 15
<211> 498
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

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

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln
165 170 175
Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser
180 185 190
Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu
195 200 205
Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr
210 215 220
Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala
225 230 235 240
Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp
245 250 255
Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu
260 265 270
Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
275 280 285
Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
290 295 300
Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
305 310 315 320
Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
325 330 335
Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
340 345 350
Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
355 360 365
Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
370 375 380
Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
385 390 395 400
Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
405 410 415
Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
420 425 430
Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
435 440 445
Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala
450 455 460
Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
465 470 475 480
Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
485 490 495
Asp Phe

<210> 16
<211> 496
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
1 5 10 15
Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
20 25 30
Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro
35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala
50 55 60
Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu
65 70 75 80
Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys
85 90 95
Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile
100 105 110
Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly
115 120 125
Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp
130 135 140
Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu
145 150 155 160
Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp
165 170 175
Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
180 185 190
Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser
195 200 205
Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
210 215 220
Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
225 230 235 240
Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
245 250 255
Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
260 265 270
Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
275 280 285
Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn
290 295 300
Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly
305 310 315 320
Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
325 330 335
Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
340 345 350
Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg
355 360 365
Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
370 375 380
Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
385 390 395 400
Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile
405 410 415
Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys
420 425 430
Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp
435 440 445
Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln
450 455 460
Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser
465 470 475 480
Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe
485 490 495

<210> 17
<211> 509
<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 17

```
Met Leu Cys Gln Pro Ala Met Leu Leu Asp Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1               5                  10                  15
Thr Met Ala Ala Ala Gln His Arg Gly Pro Glu Ala Gly Gly His Arg
            20                  25                  30
Gln Ile His Gln Val Arg Arg Gly Gln Cys Ser Tyr Thr Phe Val Val
        35                  40                  45
Pro Glu Pro Asp Ile Cys Gln Leu Ala Pro Thr Ala Ala Pro Glu Ala
    50                  55                  60
Leu Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gln Arg Asp Leu Pro Ala Ser Arg Leu
65                  70                  75                  80
His Leu Thr Asp Trp Arg Ala Gln Arg Ala Gln Arg Ala Gln Arg Val
                85                  90                  95
Ser Gln Leu Glu Lys Ile Leu Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Leu Lys
            100                 105                 110
Leu Glu Gln Ser Ile Lys Val Asn Leu Arg Ser His Leu Val Gln Ala
        115                 120                 125
Gln Gln Asp Thr Ile Gln Asn Gln Thr Thr Thr Met Leu Ala Leu Gly
    130                 135                 140
Ala Asn Leu Met Asn Gln Thr Lys Ala Gln Thr His Lys Leu Thr Ala
145                 150                 155                 160
Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Leu His Met Lys Thr Gln Met
                165                 170                 175
Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Arg Gln Met Leu Met
            180                 185                 190
Gln Ser Arg Glu Leu Gln Arg Leu Gln Gly Arg Asn Arg Ala Leu Glu
        195                 200                 205
Thr Arg Leu Gln Ala Leu Glu Ala Gln His Gln Ala Gln Leu Asn Ser
    210                 215                 220
Leu Gln Glu Lys Arg Glu Gln Leu His Ser Leu Leu Gly His Gln Thr
225                 230                 235                 240
Gly Thr Leu Ala Asn Leu Lys His Asn Leu His Ala Leu Ser Ser Asn
                245                 250                 255
Ser Ser Ser Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Thr Glu Phe Val Gln
            260                 265                 270
Arg Leu Val Arg Ile Val Ala Gln Asp Gln His Pro Val Ser Leu Lys
        275                 280                 285
Thr Pro Lys Pro Val Phe Gln Asp Cys Ala Glu Ile Lys Arg Ser Gly
    290                 295                 300
Val Asn Thr Ser Gly Val Tyr Thr Ile Tyr Glu Thr Asn Met Thr Lys
305                 310                 315                 320
Pro Leu Lys Val Phe Cys Asp Met Glu Thr Asp Gly Gly Gly Trp Thr
                325                 330                 335
Leu Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Val Asn Phe Gln Arg Thr Trp
            340                 345                 350
Glu Glu Tyr Lys Glu Gly Phe Gly Asn Val Ala Arg Glu His Trp Leu
        355                 360                 365
Gly Asn Glu Ala Val His Arg Leu Thr Ser Arg Thr Ala Tyr Leu Leu
    370                 375                 380
Arg Val Glu Leu His Asp Trp Glu Gly Arg Gln Thr Ser Ile Gln Tyr
385                 390                 395                 400
Glu Asn Phe Gln Leu Gly Ser Glu Arg Gln Arg Tyr Ser Leu Ser Val
                405                 410                 415
```

Asn Asp Ser Ser Ser Ser Ala Gly Arg Lys Asn Ser Leu Ala Pro Gln
420 425 430
Gly Thr Lys Phe Ser Thr Lys Asp Met Asp Asn Asp Asn Cys Met Cys
435 440 445
Lys Cys Ala Gln Met Leu Ser Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly
450 455 460
Leu Ser Asn Leu Asn Gly Ile Tyr Tyr Ser Val His Gln His Leu His
465 470 475 480
Lys Ile Asn Gly Ile Arg Trp His Tyr Phe Arg Gly Pro Ser Tyr Ser
485 490 495
Leu His Gly Thr Arg Met Met Leu Arg Pro Met Gly Ala
500 505

<210> 18
<211> 503
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

Tyr Thr Ile Gln Val Ser Asn Ala Thr Lys Pro Arg Lys Val Phe Cys
305 310 315 320
Asp Leu Gln Ser Ser Gly Gly Arg Trp Thr Leu Ile Gln Arg Arg Glu
325 330 335
Asn Gly Thr Val Asn Phe Gln Arg Asn Trp Lys Asp Tyr Lys Gln Gly
340 345 350
Phe Gly Asp Pro Ala Gly Glu His Trp Leu Gly Asn Glu Val Val His
355 360 365
Gln Leu Thr Arg Arg Ala Ala Tyr Ser Leu Arg Val Glu Leu Gln Asp
370 375 380
Trp Glu Gly His Glu Ala Tyr Ala Gln Tyr Glu His Phe His Leu Gly
385 390 395 400
Ser Glu Asn Gln Leu Tyr Arg Leu Ser Val Val Gly Tyr Ser Gly Ser
405 410 415
Ala Gly Arg Gln Ser Ser Leu Val Leu Gln Asn Thr Ser Phe Ser Thr
420 425 430
Leu Asp Ser Asp Asn Asp His Cys Leu Cys Lys Cys Ala Gln Val Met
435 440 445
Ser Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Leu Ser Asn Leu Asn Gly
450 455 460
Val Tyr Tyr His Ala Pro Asp Asn Lys Tyr Lys Met Asp Gly Ile Arg
465 470 475 480
Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ala Ser Arg Met
485 490 495
Met Ile Arg Pro Leu Asp Ile
500

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente a Tie2 humana e inhibe la señalización mediada por Tie2, en el que el anticuerpo comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo producido a partir de una estirpe celular depositada en la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo) con el número de acceso PTA 12295 y una región constante de IgG4 humana.

2. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

3. Una composición farmacéutica para su uso en la inhibición del crecimiento de un tumor en un paciente, comprendiendo la composición farmacéutica el anticuerpo de la reivindicación 1 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

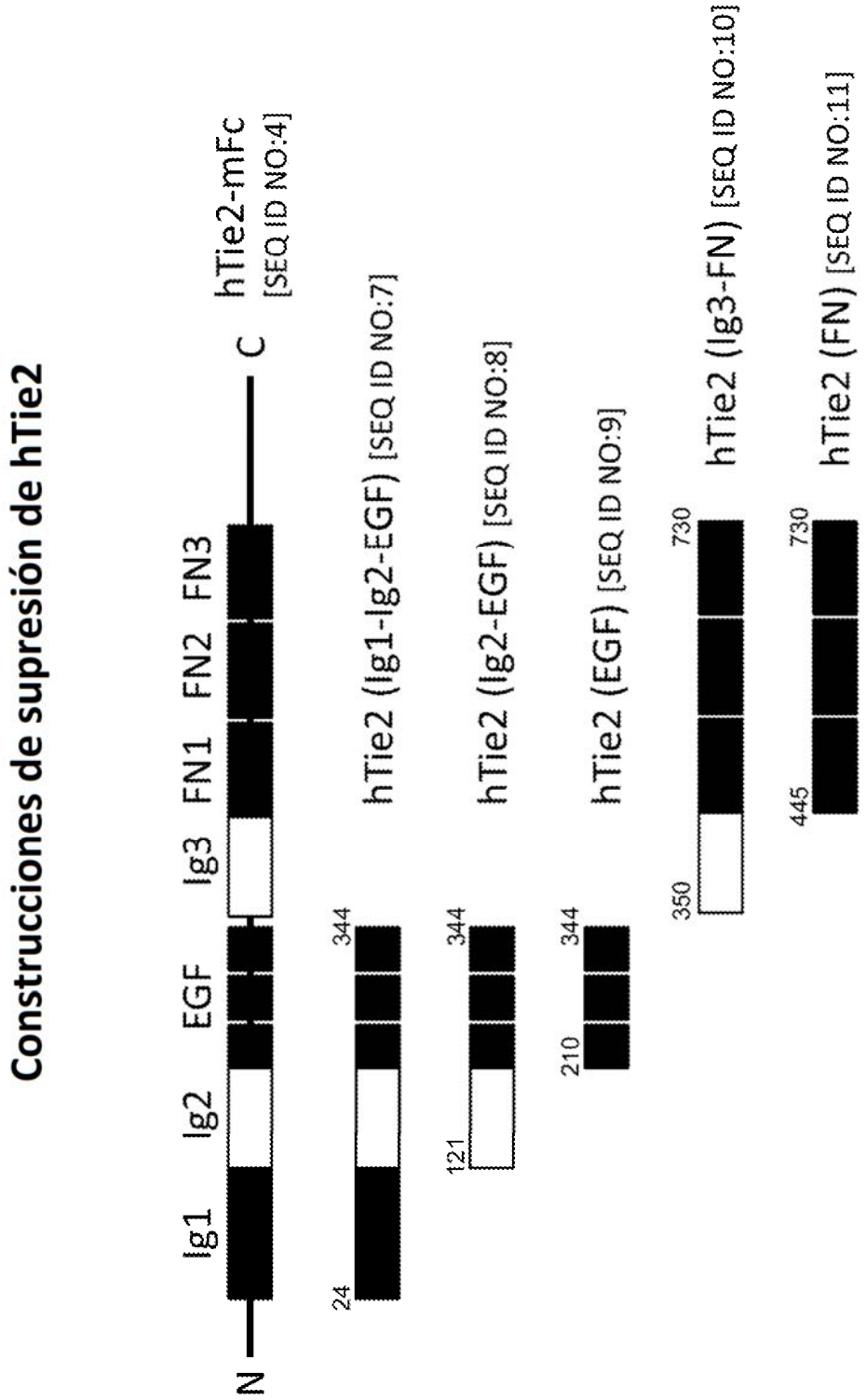
Construcciones de supresión de hTie2
N
Ig1
Ig2
EGF
Ig3
FN1
FN2
FN3
C
hTie2-mFc
[SEQ ID NO:4]
24
344
hTie2 (Ig1-Ig2-EGF) [SEQ ID NO:7]
121
344
hTie2 (Ig2-EGF) [SEQ ID NO:8]
210
344
hTie2 (EGF) [SEQ ID NO:9]
350
730
hTie2 (Ig3-FN) [SEQ ID NO:10]
445
730
hTie2 (FN) [SEQ ID NO:11]

Figura 1

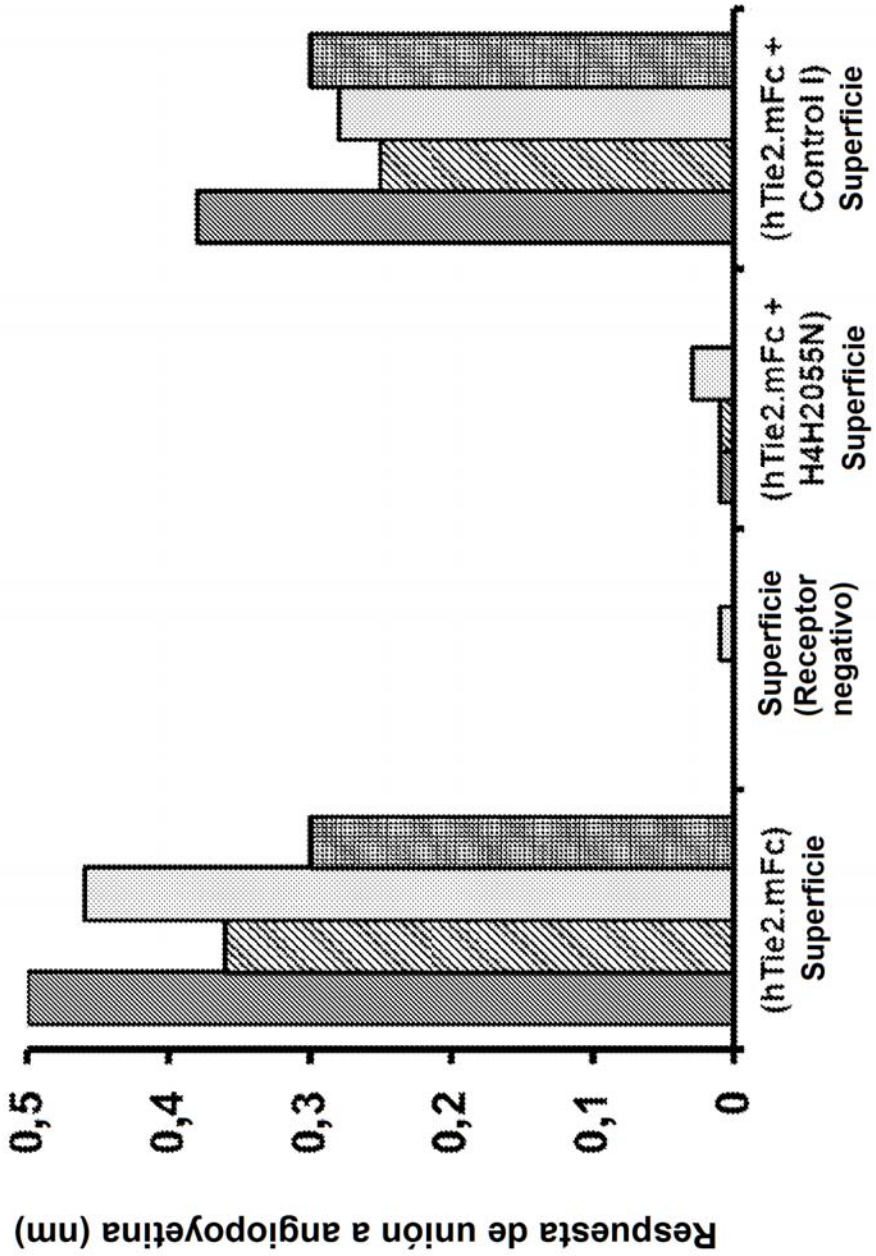
hAng1
hAng2
mAng3
hAng4
Respuesta de unión a angiopoyetina (nm)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
(hTie2.mFc) Superficie
Superficie (Receptor negativo)
(hTie2.mFc + H4H2055N) Superficie
(hTie2.mFc + Control I) Superficie

Figura 2

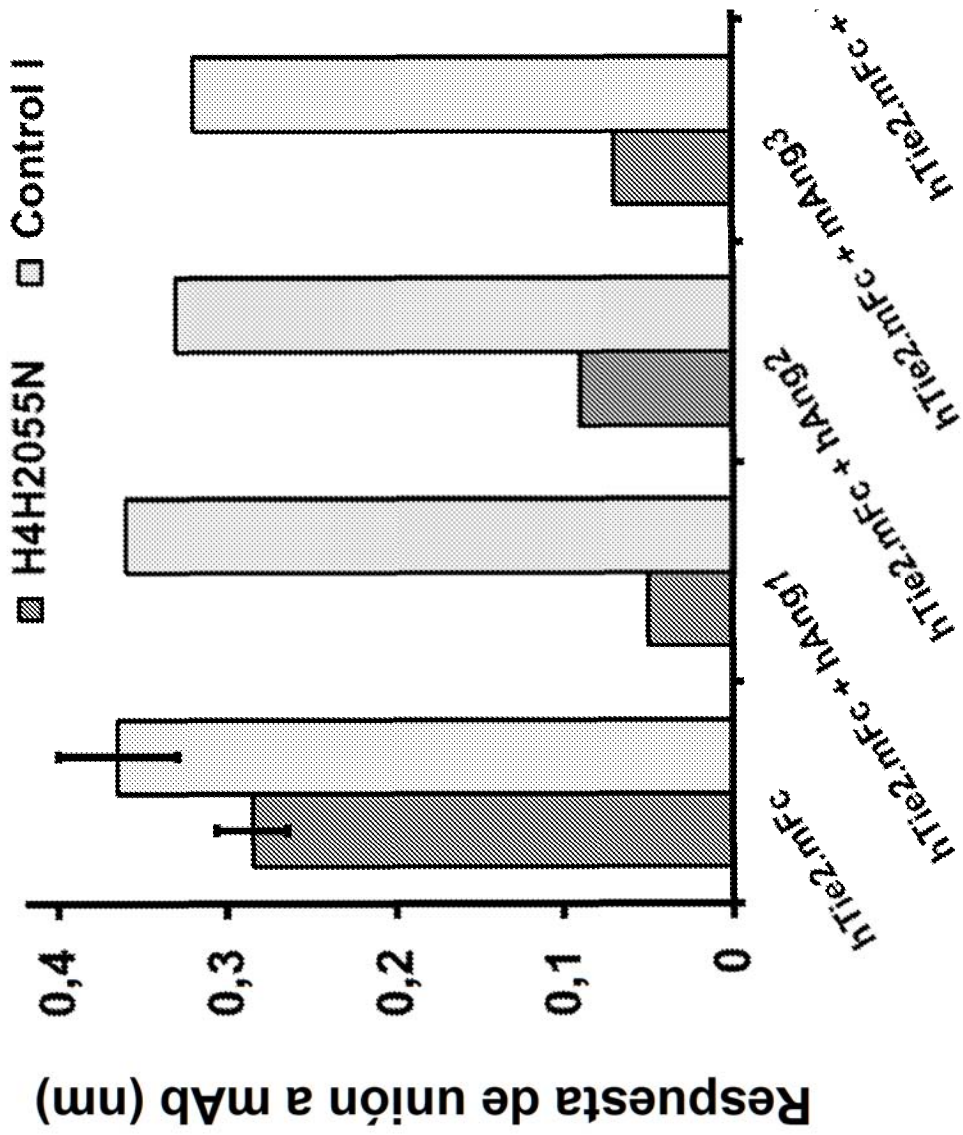
Respuesta de unión a mAb (nm)
0,4
0,3
0,2
0,1
0
H4H2055N
Control I
hTie2.mFc
hTie2.mFc + hAng1
hTie2.mFc + hAng2
hTie2.mFc + mAng3
hTie2.mFc +

Figura 3

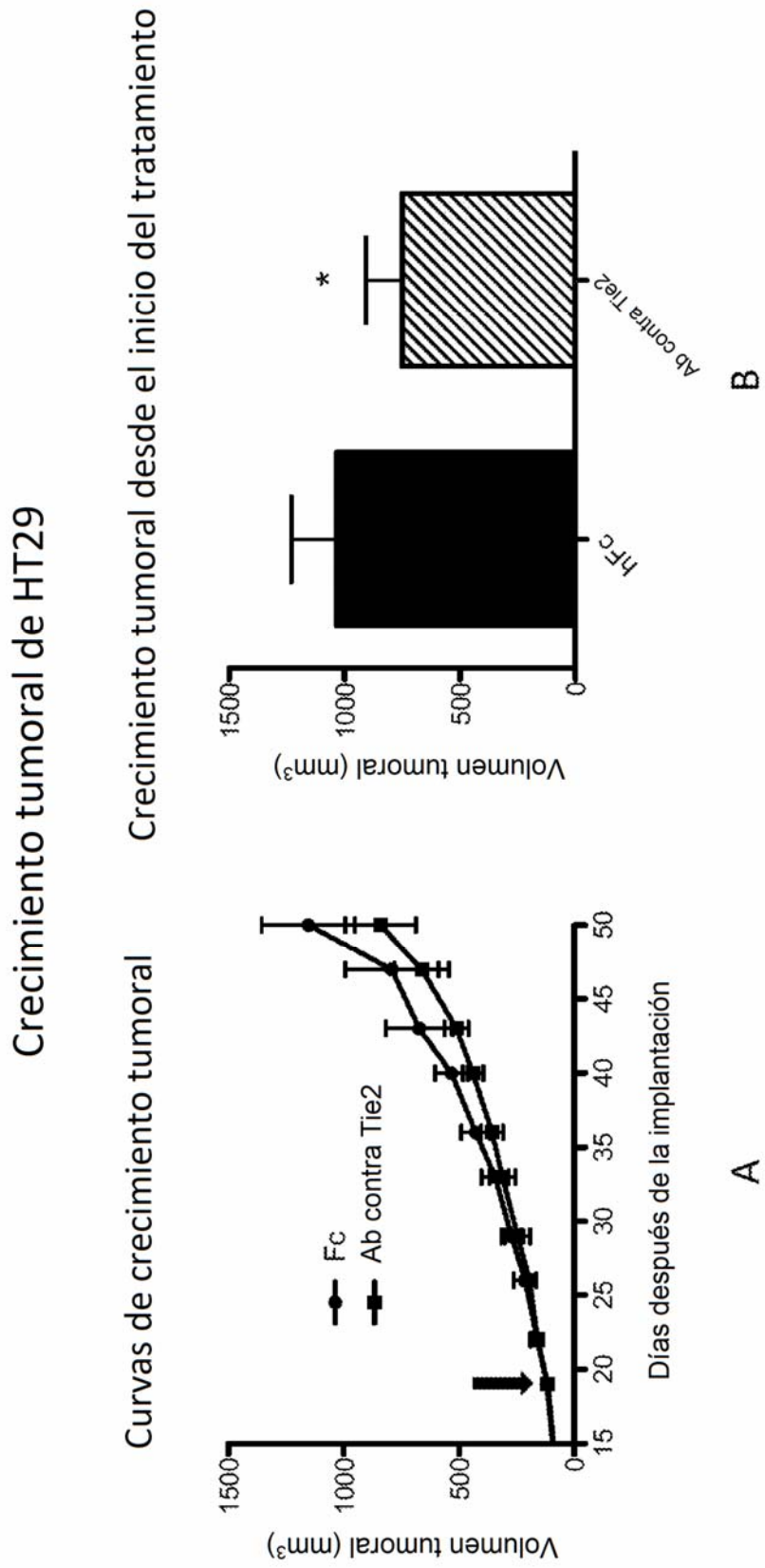
Crecimiento tumoral de HT29
Curvas de crecimiento tumoral
Fc
Ab contra Tie2
Volumen tumoral (mm3)
1500
1000
500
0
15
20
25
30
35
40
45
50
Días después de la implantación
A
Crecimiento tumoral desde el inicio del tratamiento
Volumen tumoral (mm3)
1500
1000
500
0
hFc
Ab contra Tie2
*
B

Figura 4

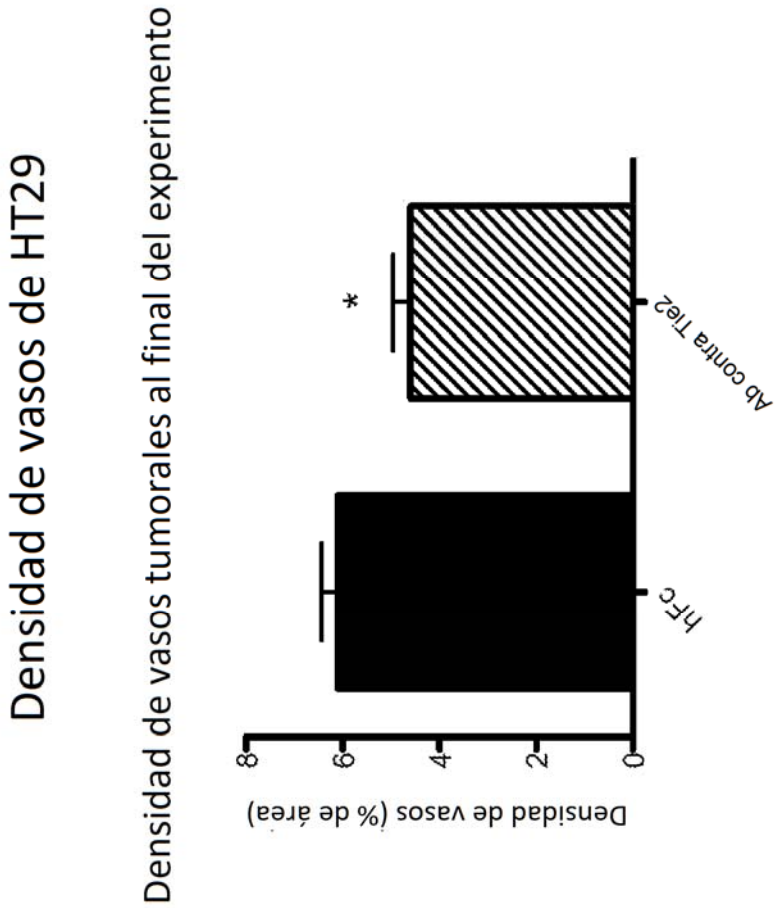
Densidad de vasos de HT29
Densidad de vasos tumorales al final del experimento
Densidad de vasos (% de área)
8
6
4
2
0
*
hFc
Ab contra Tie2

Figura 5

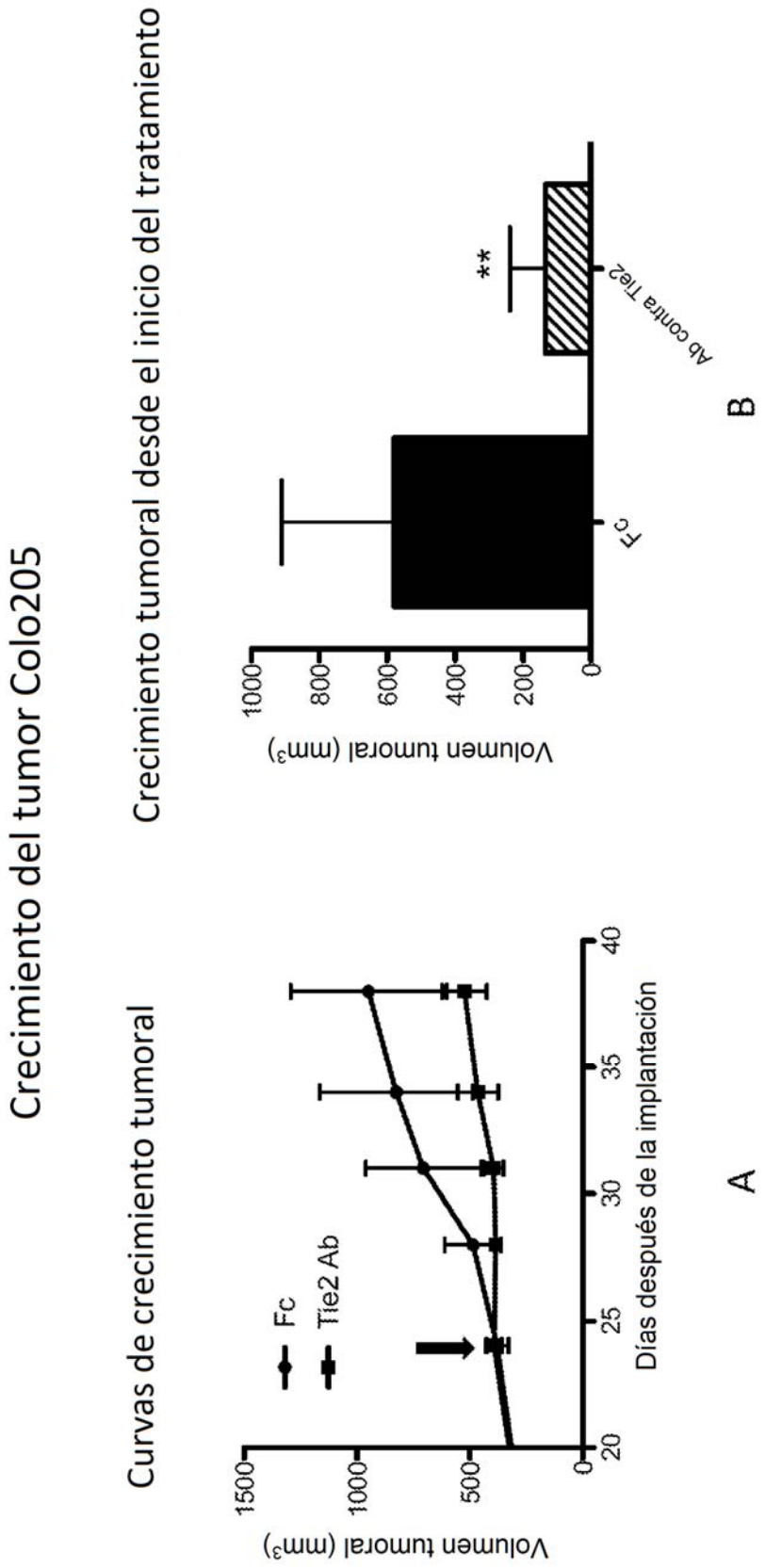
Crecimiento del tumor Colo205
Curvas de crecimiento tumoral
Fc
Tie2 Ab
Volumen tumoral (mm³)
1500
1000
500
0
20
25
30
35
40
Días después de la implantación
A
Crecimiento tumoral desde el inicio del tratamiento
Volumen tumoral (mm³)
1000
800
600
400
200
0
Fc
**
Ab contra Tie2
B

Figura 6

Densidad de vasos de Colo205

Densidad de vasos tumorales al final del experimento (21-28 días de tratamiento)

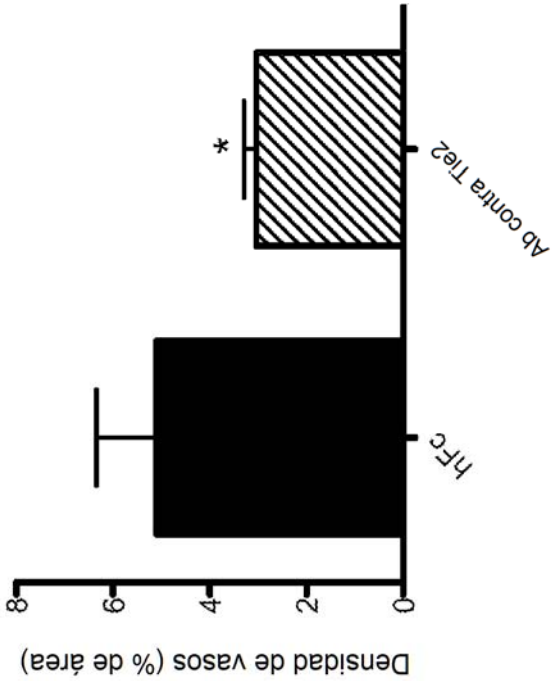


Figura 7