Organizacion y Digitalizacion CSA Ltda
CSA125847

OKA PCT

INVENTARIO

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-107938- -00000-0000
Fecha: 2010-09-01 15:17:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 307

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE Nº** 10-107938

54. **TÍTULO** **ANTICUERPOS DIRIGIDOS A ANGIOPOIETINA 1 Y ANGIOPOIETINA 2 Y USOS DE LOS MISMOS.**

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C07K 16/22

71. **SOLICITANTE** **AMGEN INC.**

DOMICILIO Thousand Oaks, California, Estados Unidos de América

74. **APODERADO** DILIA MARIA RODRIGUEZ D´ALEMAN

22. **BOGOTÁ, D.C.** 30-09-2010

17

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-107938- -00000-0000
Fecha: 2010-09-01 15:17:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 307

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

[x] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

[x] Capitulo I. [ ] Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	**Nombre:** **AMGEN INC.** **Dirección:** One Amgen Center Drive, Patent Operations, M/S 28-2-C, Thousand Oaks, California 91320-1799, Estados Unidos. **Nacionalidad o domicilio:** Thousand Oaks, California, Estados Unidos de América **Lugar de Constitución:** California, Estados Unidos de América **Teléfono:** **Fax:** **E-mail**	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** [ ] **NIT** [ ] **C.E.** [ ] **Otro** [ ] **Número**
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6 Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824 E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** C.C. [x] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Número 41.654.882 TP 20824 CSJ
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: **BOONE, Thomas C. y OLINER, Jonathan D.** Dirección: **2715 Kelly Knoll Lane, Newbury Park, California 91320, Estados Unidos y 959 Golden Crest Avenue, Newbury Park, California 91320, Estados Unidos.** Nacionalidad o domicilio: Estadounidenses	

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2009/001122** Fecha **20 de febrero de 2009**

Publicación Internacional No. **WO 2009/105269 A1** Fecha **27 de agosto de 2009**

6 TITULO (54) **ANTICUERPOS DIRIGIDOS A ANGIOPOIETINA 1 Y ANGIOPOIETINA 2 Y USOS DE LOS MISMOS.**

7 Clasificación Internacional (51) C07K 16/22

8 Prioridad SI [x] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	20 de febrero de 2008	61/066,632
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	16 de junio de 2008	61/061,943
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	19 de diciembre de 2008	61/139,361

9 Comprobante de pago No. 10-63,092 // 10-63,182 // 10-63,239 // 10-52,621
Fecha 03/08/10 // 03/08/10 // 03/08/10 // 29/06/10

10 ANEXOS

- [ ] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [ ] Poderes si fuere el caso
- [x] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [x] Declaraciones
- [ ] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso copia de contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- [ ] Arte final 12 X 12 .
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- [ ] Otros Request

11 FIGURA CARACTERÍSTICA

12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 **T.P. 20824**

As. P-2656

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,092
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-107938- -00000-0000

Fecha: 2010-09-01 15:17:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 307

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL : $	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

17-2650 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,182
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-107938- -00000-0000
Fecha: 2010-09-01 15:17:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 307

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	82	INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	155,000.00
			TOTAL : $	155,000.00

SON: CIENTO CINCUENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,239
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-107938- -00000-0000
Fecha: 2010-09-01 15:17:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 307

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** C.O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI	26,000.00
		TOTAL : $	26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 52,621
FECHA : JUNIO 29 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-107938- -00000-0000
Fecha: 2010-09-01 15:17:05 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 307

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325811511	28/06/2010	85,900,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	1,000.00
		TOTAL : $	1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

5

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se describen agentes de enlace específicos, tales como anticuerpos completamente humanos, que se enlazan a angiopoietina 1 y/o angiopoietina 2. También se describen fragmentos de cadena pesada, fragmentos de cadena ligera, y CDRs de los anticuerpos, así como métodos de elaboración y uso de los anticuerpos.

ANTICUERPOS DIRIGIDOS A ANGIOPOIETINA 1 Y ANGIOPOIETINA 2 Y USOS DE LOS MISMOS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de E.U.A., número de serie 61/139,361 presentada el 19 de diciembre de 2008, y la Solicitud Provisional de E.U.A., número de serie 61/061,943 presentada el 16 de junio de 2008, y la Solicitud Provisional de E.U.A., número de serie 61/066,632 presentada el 20 de febrero de 2008 la cual se incorpora en la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a agentes de enlace específicos que reconocen y enlazan a las angiopoietinas 1 (Ang-1) y/o angiopoietina 2 (Ang-2). Más específicamente, la invención se refiere a la producción, uso de diagnóstico, y uso terapéutico de anticuerpos monoclonales y policlonales, y los fragmentos de enlace a antígenos de los mismos, los cuales enlazan específicamente a Ang-1 y/o Ang-2. Aspectos de la invención también se refieren a hibridomas u otras líneas celulares que expresan tales anticuerpos. Los anticuerpos descritos son útiles para el diagnóstico y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad y sobreproducción de Ang-1 o Ang-2.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

Existen diversas enfermedades conocidas por asociarse con la angiogénesis desregulada o indeseable. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, neovascularización ocular, tal como retinopatías, incluyendo retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, psoriasis, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, tal como una enfermedad inflamatoria reumatoide o reumática, especialmente artritis (incluyendo artritis reumatoide), u otros trastornos inflamatorios crónicos, tales como asma crónica, aterosclerosis arterial o posterior al trasplante, endometriosis, y enfermedades neoplásicas, por ejemplo los denominados tumores sólidos y tumores líquidos (o hematopoiéticos) (tales como leucemias y linfomas). Otras enfermedades asociadas con la angiogénesis indeseable serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

8

Aunque muchos sistemas de transducción de señales han sido implicados en la regulación de la angiogénesis, uno de los sistemas mejor caracterizado y más selectivo de células endoteliales involucra la tirosina cinasa del receptor Tie-2 (referido como "Tie-2" o "Tie-2R" (también referido como "ORK"); Tie-2 murino también referido como "tek") y sus ligandos, las angiopoietinas (Gale, N. W. and Yancopoulos, G. D., *Genes Dev.* 13:1055-1066 [1999]). Existen 4 angiopoietinas conocidas; angiopoietina 1 ("Ang-1") a la angiopoietina 4 ("Ang-4"). Estas angiopoietinas se refieren también como "ligandos Tie-2". (Davis, S., *et al., Cell, 87*:1161-1169 [1996]; Grosios, K., *et al., Cytogenet Cell Genet, 84*:118-120 [1999]; Holash, J., *et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42*:1617-1625 [1999]; Koblizek, T. I., *et al., Current Biology, 8*:529-532 [1998]; Lin, P., *et al., Proc Natl Acad Sci USA, 95*:8829-8834 [1998]; Maisonpierre, P. C., *et al., Science, 277*:55-60 [1997]; Papapetropoulos, A., *et al., Lab Invest, 79*:213-223 [1999]; Sato, T. N., *et al., Nature, 375*:70-74 [1998]; Shyu, K. G., *et al., Circulation, 98*:2081-2087 [1998]; Suri, C., *et al., Cell, 87*:1171-1180 [1996]; Suri, C., *et al., Science, 282*:468-471 [1998]; Valenzuela, D. M., *et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96*:1904-1909 [1999]; Witzenbichler, B., *et al., J Biol Chem, 273*:18514-18521 [1998]). Considerando que el enlace de Ang-1 a Tie-2

estimula la fosforilación del receptor en células endoteliales cultivadas, Ang-2 ha sido observado tanto para agonizar como antagonizar la fosforilación del receptor Tie-2 (Davis, S., *et al.*, [1996], *supra;* Maisonpierre, P.C., *et al.*, [1997], *supra;* Kim, I., J.H. Kim, *et al.*, Oncogene 19(39): 4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewska, K., P.C. Maisonpierre, *et al.*, Cardiovascular Research 49(3): 659-70 (2001)).

Los fenotipos de los genes inactivados Tie-2 y Ang-1 de ratón son similares y sugieren que la fosforilación de Tie-2 estimulada por Ang-1 media la remodelación y estabilización de los vasos que se desarrollan *in utero* a través del mantenimiento de adhesión celular con soporte celular endotelial (Dumont, D. J., *et al.*, *Genes & Development*, *8*:1897-1909 [1994]; Sato, T. N., *et al.*, *Nature*, *376*:70-74 [1995]; Suri, C., *et al.*, [1996], *supra*). El papel de Ang-1 en la estabilización de vasos se cree que se conserva en el adulto, en donde se expresa amplia y constitutivamente (Hanahan, D., *Science*, *277*:48-50 [1997]; Zagzag, D., *et al.*, *Experimental Neurology*, *159*:391-400 [1999]). En contraste, la expresión Ang-2 se limita principalmente a sitios de remodelación vascular, donde se cree que bloquea la función Ang-1, con lo cual se induce un estado de plasticidad vascular que conduce a la angiogénesis (Hanahan, D., [1997],

supra; Holash, J., *et al.*, *Science*, *284*:1994-1998 [1999]; Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], *supra*).

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

11

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

Determinados estudios funcionales sugieren que Ang-2 puede estar involucrado en la angiogénesis de tumor. Ahmad *et al.* (*Cancer Res.*, 61:1255-1259 [2001]) describen la sobre-expresión de Ang-2 y muestran que está supuestamente asociada con un incremento en el crecimiento de tumores en un modelo de xenoinjerto de ratones. Ver también Etoh *et al.*, *supra*, y Tanaka *et al.*, *supra*, en donde se presentan datos que supuestamente asocian la sobre-expresión de Ang-2 con la hipervascularidad de tumores. Sin embargo, en contraste, Yu *et al.* (*Am. J. Path.*, 158:563-570 [2001]) reportan datos para mostrar que la sobreexpresión de Ang-2 en células del carcinoma de pulmón de Lewis y el carcinoma mamario de TA3 supuestamente prolongó la supervivencia de ratones inyectados con los transfectantes correspondientes.

En los recientes años anteriores, diversas publicaciones han sugerido a Ang-1, Ang-2 y Tie-2 como un objetivo posible para la terapia anti-cáncer. Por ejemplo, las patentes de E.U.A. Nos. 6,166,185, 5,650,490, y 5,814,464 describen cada una el concepto de anticuerpos del ligando anti-Tie-2 y cuerpos de receptor. La publicación de la solicitud de

patente de E.U.A. No. 2003/0124129A1 describe determinados anticuerpos anti-Ang 2 y su uso en el tratamiento del cáncer. Lin *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95:8829-8834 [1998]) inyectaron un adenovirus que expresa un Tie-2 soluble dentro de ratones; el Tie-2 soluble supuestamente disminuyó el número y tamaño de los tumores desarrollados por los ratones. En un estudio relacionado, Lin *et al.* (*J. Clin. Invest.*,100:2072-2078 [1997]) inyectaron una forma soluble de Tie-2 en ratas; este compuesto supuestamente redujo el tamaño del tumor en ratas. Siemeister *et al.* (*Cancer Res.*, 59:3185-3189 [1999]) generaron líneas celulares de melanoma humano que expresan el dominio extracelular de Tie-2, inyectaron estas líneas celulares en ratones sin pelo, y concluyeron que el Tie-2 soluble supuestamente resultaba en una "inhibición importante" del crecimiento del tumor y la angiogénesis del tumor.

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

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Aunque mucha de la evidencia señala a la utilidad de inhibir niveles de Ang2 en el tratamiento de la angiogénesis indeseable (o cualquier subconjunto de condiciones que involucren la generación indeseable de vasos sanguíneos, como la arteriogénesis), el estado del arte actual no deja claro si la inhibición simultánea de Ang1 sería benéfica en tales terapias y si es así, qué grado de inhibición de Ang1, además de la inhibición de Ang2, pudiera probar proporcionar al menos un efecto terapéutico aditivo. Consecuentemente, la presente invención atiende una necesidad no reconocida de identificar nuevos agentes que reconozcan y enlacen específicamente a ambos ligandos Ang-1 y Ang-2. Los agentes de enlace, tales como los anticuerpos de la presente invención, tienen los niveles de actividad deseados al inhibir Ang2 así como Ang1 que los hagan particularmente útiles en una diversidad de entornos tales como selección de diagnóstico, bioensayos, e intervención terapéutica en enfermedades que se asocian con la actividad de Ang-1 y/o Ang-2, tales como cáncer, inflamación, y otras enfermedades relacionadas con la angiogénesis indeseable.

Las diversas modalidades de la invención se refieren a agentes de enlace dirigidos que enlazan específicamente a Ang-1 y/o Ang-2 y en ello inhiben la angiogénesis fisiológica o patológica. Mecanismos por los cuales esto se puede lograr

pueden incluir, pero no se limitan a, ya sea la inhibición de enlace de Ang-1 y/o Ang-2 al receptor Tie1 y/o Tie2, inhibición de Ang-1 y/o Ang-2, señalización inducida de Tie1 y/o Tie2, o depuración creciente de Ang1 y/o Ang-2 del cuerpo de un paciente, reduciendo con ello la concentración efectiva de Ang-1 y/o Ang-2.

Una modalidad de la invención, el agente de enlace específico es un anticuerpo completamente humano que enlaza específicamente a Ang-1 y/o Ang-2 y evita que Ang-1 y/o Ang-2 enlacen a los receptores Tie1 y/o Tie2. Todavía otra modalidad de la invención es un anticuerpo monoclonal completamente humano que se enlaza a Ang-1 y/o Ang-2 y también inhibe la fosforilación de Tie1 y/o Tie2 inducida por Ang-1 y/o Ang-2phosphorylation. El anticuerpo puede enlazar a Ang-1 y/o Ang-2 con una Kd de menos de alrededor de 100 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM , 5 pM o 1pM. Determinadas modalidades de la invención son anticuerpos del tipo IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4.

Otra modalidad de la invención proporciona un agente de enlace tal como un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de H2 (SEQ ID NO. 1); H3 (SEQ ID NO. 2); H4(SEQ ID NO. 3); H6 (SEQ ID NO. 4); H10(SEQ ID NO. 5); H11 (SEQ ID NO. 6); H5P (SEQ ID NO. 7); y fragmentos de enlace a antígenos de

las mismas; y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de: L1 (SEQ ID NO. 8); L2 (SEQ ID NO. 9); L4 (SEQ ID NO. 10); L6 (SEQ ID NO. 11); L7 (SEQ ID NO. 12); L8 (SEQ ID NO. 13); L9 (SEQ ID NO. 14); L11 (SEQ ID NO. 15); L12 (SEQ ID NO. 16); L13 (SEQ ID NO. 17); y fragmentos de enlace a antígenos de las mismas.

La invención también contempla un agente de enlace específico que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste de: H2 (SEQ ID NO. 1); H3 (SEQ ID NO. 2); H4(SEQ ID NO. 3); H6 (SEQ ID NO. 4); H10(SEQ ID NO. 5); H11 (SEQ ID NO. 6); H5P (SEQ ID NO. 7); L1 (SEQ ID NO. 8); L2 (SEQ ID NO. 9); L4 (SEQ ID NO. 10); L6 (SEQ ID NO. 11); L7 (SEQ ID NO. 12); L8 (SEQ ID NO. 13); L9 (SEQ ID NO. 14); L11 (SEQ ID NO. 15); L12 (SEQ ID NO. 16); L13 (SEQ ID NO. 17); y fragmentos de enlace a antígenos de las mismas.

Se apreciará que el agente de enlace específico puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado o completamente humano. El anticuerpo puede ser también un anticuerpo de cadena sencilla. Otros ejemplos de agentes de enlace específicos incluyen pepticuerpos, tales como el pepticuerpo mL4-3, avímeros, otras formas de moléculas de péptidos (tales como moléculas de fusión Fc y moléculas de fusión Ab (ver la tecnología CovX-Pfizer)) que contienen secuencias de péptidos

que reconocen y se enlazan a un objetivo de proteínas (en este contexto, ligandos Ang2 y/o Ang1), etc.

Una modalidad específica de la invención se refiere a pepticuerpos tales como mL4-3 que enlazan a Ang1. Otras modalidades de la invención incluyen la porción de péptido de mL4-3 así como péptido de enlace a Ang1 similares que se pueden hacer por adición, eliminación, y/o inserción de aminoácidos hacia y desde este péptido. Adiciones, eliminaciones, o inserciones similares se pueden hacer a la porción Fc del pepticuerpo mL4-3. Además, alteraciones al mL4-3 y pepticuerpos en general son bien conocidas en la técnica y se enseñan en, por ejemplo, WO00/24782 y WO03/057134 las cuales se incorporan en la presente por referencia a las secciones las cuales describen y enseñan hacer agentes de enlace que contengan un péptido generado aleatoriamente el cual se enlace a un objetivo deseado.

La invención se refiere además a un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, así como a líneas celulares que contienen (a través de algunos medios tales como por transfección, transformación, electroporación) con las secuencias de ácidos nucleicos necesarios para expresar los agentes de enlace específicos actuales tales como los anticuerpos aquí descritos.

También se apreciará que la invención se refiere a conjugados como se describe en la presente. El conjugado

puede ser, por ejemplo, un agente de enlace específico (tal como un anticuerpo) de la invención conjugado a otra(s) molécula(s) proteínica, de carbohidratos, lípidos o de porción mezclada.

La invención se refiere además a moléculas de ácidos nucleicos que codifican los agentes de enlace específicos (tal como un anticuerpo) de la invención, así como un vector que comprende tal molécula de ácido nucleico, así como una célula hospedera que contiene el vector.

Adicionalmente, la invención proporciona un método para hacer un agente de enlace específico que comprende, (a) transformar una célula hospedera con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica el agente de enlace específico; (b) expresar la molécula de ácido nucleico en dicha célula hospedera; y (c) aislar dicho agente de enlace específico. La invención además proporciona un método para elaborar un anticuerpo que comprende: (a) transformar una célula hospedera con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención; (b) expresar la molécula de ácido nucleico en dicha célula hospedera; y (c) aislar dicho agente de enlace específico.

Además, la invención se refiere a un método para inhibir la angiogénesis indeseable en un mamífero al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de enlace específico de acuerdo con la invención. La invención también

contempla un método para tratamiento del cáncer en un mamífero al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de enlace específico de acuerdo con la invención.

La invención también se relaciona con un método para inhibir angiogénesis indeseable en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la invención. La invención adicionalmente proporciona un método para tratamiento del cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo de acuerdo con la invención.

Se apreciará que la invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de enlace específico de acuerdo con la invención y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender un anticuerpo de acuerdo con la invención y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona un método para modular o inhibir la actividad de angiopoietina 2 al administrar uno o más agentes de enlace específicos de la invención. La invención también contempla un método para modular o inhibir la actividad de angiopoietina 2 al administrar un anticuerpo de la invención.

La invención se refiere además a un método para modular al menos una de permeabilidad vascular o escape de plasma en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del agente de enlace específico de acuerdo con la invención. La invención también se relaciona con un método para tratar al menos uno de enfermedad neovascular ocular, obesidad, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, trastornos inflamatorios, aterosclerosis, endometriosis, enfermedad neoplásica, enfermedad relacionada con los huesos, o psoriasis en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de enlace específico de acuerdo con la invención.

La invención además proporciona un método para modular al menos una de permeabilidad vascular o escape de plasma en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la invención. La invención también se relaciona con un método para tratar al menos una de enfermedad neovascular ocular, obesidad, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, trastornos inflamatorios, aterosclerosis, endometriosis, enfermedad neoplásica, enfermedad relacionada con los huesos, o psoriasis en un mamífero que comprende administrar una cantidad

terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Más aún, la invención se refiere a un método para tratamiento del cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de enlace específico de acuerdo con la invención y un agente quimioterapéutico. Se apreciará por aquellos en la técnica que el agente de enlace específico y agente quimioterapéutico no necesitan administrarse simultáneamente.

La invención también contempla un agente de enlace específico que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR 1) de cualquiera de: SEQ ID NO. 18; La invención se refiere además a un agente de enlace específico que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR 2) de cualquiera de: SEQ ID NO. 26; SEQ ID NO. 27; SEQ ID NO. 28; SEQ ID NO. 29; y fragmentos de enlace a antígenos de las mismas.

La invención también se relaciona con un agente de enlace específico que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR 3) de cualquiera de: SEQ ID NO. 32; SEQ ID NO. 34; SEQ ID NO. 35; SEQ ID NO. 37; SEQ ID NO. 38; SEQ ID NO. 39); y fragmentos de enlace a antígenos de las mismas.

La invención también contempla un agente de enlace específico que comprende la región determinante de la

complementariedad de cadena ligera 1 (CDR 1) de cualquiera de: SEQ ID NO. 19; SEQ ID NO. 20; SEQ ID NO. 21; SEQ ID NO. 22; SEQ ID NO. 23; SEQ ID NO. 24; SEQ ID NO. 25; y fragmentos de enlace a antígenos de las mismas;

La invención se refiere además a un agente de enlace específico que comprende la región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (CDR 2) de cualquiera de: SEQ ID NO. 27; SEQ ID NO. 30; SEQ ID NO. 31; y fragmentos de enlace a antígenos de las mismas.

La invención también se relaciona con un agente de enlace específico que comprende la región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (CDR 3) de cualquiera de: SEQ ID NO.33; SEQ ID NO. 36; SEQ ID NO. 40; y fragmentos de enlace a antígenos de las mismas.

Otras modalidades de la invención incluyen moléculas aisladas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anticuerpos aquí descritos, vectores que tienen moléculas aisladas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-Ang-1 y/o Anti-Ang-2 o una célula hospedera transformada con cualquiera de tales moléculas de ácidos nucleicos. Además, una modalidad de la invención es un método para producir un anticuerpo anti-Ang-1 y/o anti-Ang-2 al cultivar células hospederas bajo condiciones en donde una molécula de ácido nucleico se expresa para producir el anticuerpo seguido por la recuperación del anticuerpo. Se debe observar que las

modalidades de la invención también incluyen cualquier molécula de ácido nucleico la cual codifique un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo de la invención incluyendo secuencias de ácidos nucleicos optimizadas para incrementar rendimientos de anticuerpos o fragmentos de los mismos cuando se transfectan en células hospederas para la producción de anticuerpos.

Una modalidad adicional en la presente incluye un método para producir anticuerpos de alta afinidad para Ang-1 y/o Ang-2 al inmunizar a un mamífero con Ang-1 o 2 humana, o un fragmento de la misma, y una o más secuencias ortólogas o fragmentos de las mismas.

Además, la invención se refiere a un método para detectare el nivel de Ang -1 o Ang-2 en una muestra biológica al (a) poner en contacto un agente de enlace específico de la invención con la muestra; y (b) determinar el grado de enlace del agente de enlace específico a la muestra. La invención también se relaciona con un método para detectar el nivel de Ang-2 en una muestra biológica al (a) poner en contacto un anticuerpo de la invención con la muestra; y (b) determinar el grado de enlace del anticuerpo a la muestra.

La invención también se relaciona con un método para inhibir angiogénesis indeseable en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o composición como se describe en la presente.

La invención también se relaciona con un método para modular angiogénesis en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o composición como se describe en la presente. La invención se refiere además a un método para inhibir el crecimiento del tumor caracterizado por angiogénesis indeseable en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o composición como se describe en la presente. Adicionalmente, la invención se refiere a un método para tratamiento del cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o composición como se describe en la presente, y un agente quimioterapéutico. El polipéptido o composición específicos como se describe en la presente y agente quimioterapéutico no necesitan administrarse simultáneamente. En una modalidad preferida, el agente quimioterapéutico es al menos uno de 5-FU, CPT-11, y Taxotere. Se apreciará, sin embargo, que se pueden usar otros agentes quimioterapéuticos adecuados y otras terapias de cáncer.

Adicionalmente, la invención se refiere a un método para tratamiento del cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o composición como se describe en la presente, y un agente anti-VEGF o un inhibidor de multicinasa (MKI). En

una modalidad preferida, el agente anti-VEGF, o un inhibidor de multicinasa (MKI) se escogería de Avastin® (bevacizumab), Lucentis® (ranibizumab), Macugen® (pegaptanib), Sutent® (sunitinib), Nexavar® (sorafenib), difosfato de motesanib, Zactima® (vandetanib), Recentin (AZD 2171), AG-013736 (axitinib). Se apreciará, sin embargo, que se pueden usar otros agentes anti-angiogénicos adecuados y otras terapias para el cáncer.

Se apreciará que los agentes de enlace específicos de la invención se usan para tratar diversas enfermedades asociadas con la angiogénesis desregulada o indeseable. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, neovascularización ocular, tales como retinopatías (incluyendo retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad) psoriasis, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, tal como una enfermedad inflamatoria reumatoide o reumática, especialmente artritis (incluyendo artritis reumatoide), u otros trastornos inflamatorios crónicos, tal como asma crónica, aterosclerosis arterial o posterior al transplante, endometriosis, y enfermedad neoplásicas, por ejemplo los denominados tumores sólidos y tumores líquidos (tales como leucemias). Las enfermedades adicionales las cuales se pueden tratar por la administración del agente de enlace específicos serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Tales

enfermedades adicionales incluyen, pero no se limitan a, obesidad, permeabilidad vascular, escape de plasma, y trastornos relacionados con los huesos, incluyendo osteoporosis. Así, la invención se refiere además a métodos para tratar estas enfermedades asociadas con la angiogénesis desregulada o indeseable.

Modalidades adicionales de la invención incluyen un agente de enlace específico que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste de: SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO. 2; SEQ ID NO. 3; SEQ ID NO. 4; SEQ ID NO. 5; SEQ ID NO. 6; SEQ ID NO. 7; SEQ ID NO. 8; SEQ ID NO. 9; SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 11; SEQ ID NO. 12; SEQ ID NO. 13; SEQ ID NO. 14; SEQ ID NO. 15; SEQ ID NO. 16; SEQ ID NO. 17; y fragmentos de enlace a antígenos del mismo. También se contemplan anticuerpos que contienen las secuencias de polipéptidos antes mencionadas. Estos anticuerpos son anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, o completamente humanos. Son anticuerpos de cadena sencilla así como anticuerpos de cadena múltiple. Los hibridomas, que producen los anticuerpos monoclonales también se contemplan, así como, moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos y los anticuerpos, los vectores que contienen estas moléculas de ácidos nucleicos, y las células hospederas, tales como células CHO, que las contienen y expresan. Un método para hacer un agente de enlace o un

anticuerpo de la presente invención comprende transformar una célula hospedera con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica el agente de enlace o anticuerpo; expresar la molécula de ácido nucleico en dicha célula hospedera; y aislar dicho agente de enlace específico o anticuerpo.

Un uso de diagnóstico de la invención incluye un método para detectar el nivel de angiopoietina 1 y/o angiopoietina 2 en una muestra biológica que comprende poner en contacto un anticuerpo o agente de enlace aquí descrito con dicha muestra biológica; y determinar el grado de enlace del anticuerpo o agente de enlace a la muestra.

Entre los usos terapéuticos específicos de la invención, están los métodos para inhibir angiogénesis indeseable (o cualquier subconjunto de condiciones que involucren la generación indeseable de vasos sanguíneos, como la arteriogenesis), en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de los polipéptidos aislados o los agentes de enlace tales como los anticuerpos hechos a partir de ellos. Entre tales angiogénesis indeseables (o cualquier subconjunto de condiciones que involucren la generación indeseable de vasos sanguíneos, como la arteriogénesis), están el cáncer y enfermedades inflamatorias en mamíferos. Por lo tanto, se contempla una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado, agente de enlace o anticuerpo de la invención en

mezcla con un portador farmacéutico para ello. Agentes de formulación farmacéuticamente aceptables, por supuesto, se usan a menudo para preparar tales composiciones farmacéuticas para administración a sujetos que los necesitan.

Otros métodos de uso de las composiciones de la presente invención incluyen un método para modular o inhibir angiopoietina 1 y/o la actividad de angiopoietina 2 que comprende administrar a un paciente el polipéptido aislado, agente de enlace o anticuerpo aquí descrito. Tales métodos para modular o inhibir la actividad de angiopoietina 1 y/o angiopoietina 2 comprenden administrar a un paciente el polipéptido, agente de enlace, o anticuerpo aquí descrito. Tales métodos incluyen modular al menos una de permeabilidad vascular o escape de plasma en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido aislado, agente de enlace o anticuerpo aquí descrito. También se incluyen métodos para tratar al menos una de enfermedad neovascular ocular, obesidad, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, trastornos inflamatorios, aterosclerosis, endometriosis, enfermedad neoplásica, enfermedad relacionada con los huesos, o psoriasis.

También se contempla un método de comboterapia (terapia de combinación) tal como un método para tratamiento del cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad

terapéuticamente efectiva de un polipéptido aislado, agente de enlace o anticuerpo aquí descrito y un agente quimioterapéutico. En tales métodos, algunas veces el polipéptido aislado, agente de enlace o anticuerpo y el agente quimioterapéutico se administran simultáneamente y en otros momentos no lo hacen, dependiendo de la condición específica, aprobación reglamentaria, y el juicio de los profesionales médicos.

Otros tipos de comboterapia incluyen un método para tratamiento del cáncer en un mamífero que comprende administrar a un sujeto que necesita del mismo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido aislado, agente de enlace o anticuerpo aquí descrito y una segunda molécula que enlaza a un ligando a cualquiera de los receptores VEGF 1-3. Ejemplos de tales segundas moléculas que enlazan a un ligando a cualquiera de los receptores VEGF 1-3 son Avastin®, Lucentis®, y Macugen®.

El uso de los polipéptidos, agentes de enlace, o anticuerpos aquí descritos también se contemplan en combinación con agentes de molécula pequeña para la administración terapéutica a sujetos que necesitan de los mismo. Tales agentes de molécula pequeña incluyen aquellos que modulan la señalización de cualquiera de los receptores VEGF 1-3 así como aquellos que son inhibidores de multicinasas. Por ejemplo, Sutent®, Nexavar®, difosfato de

Motesanib, Axitinib, Zactima, AZD 2171, Recentin, y AG-013736 se contemplan para uso en comboterapia con los polipéptidos, agentes de enlace, y anticuerpos aquí descritos.

Ciertas otras modalidades de la invención se refieren a un agente de enlace específico que comprende CDR 1 de cualquiera de SEQ ID NO. 18; SEQ ID NO. 19; SEQ ID NO. 20; SEQ ID NO. 21; SEQ ID NO. 22; SEQ ID NO. 23; SEQ ID NO. 24; SEQ ID NO. 25; un agente de enlace específico que comprende CDR 2 de cualquiera de SEQ ID NO. 26; SEQ ID NO. 27; SEQ ID NO. 28; SEQ ID NO. 29; SEQ ID NO. 30; SEQ ID NO. 31; y un agente de enlace específico que comprende CDR 3 de cualquiera de SEQ ID NO. 32; SEQ ID NO. 33; SEQ ID NO. 34; SEQ ID NO. 35; SEQ ID NO. 36; SEQ ID NO. 37; SEQ ID NO. 38; SEQ ID NO. 39; SEQ ID NO. 40. El agente de enlace específico puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, o 6 CDRs.

Similarmente, se contemplan las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los agentes de enlace específicos antes mencionados. También se contempla un método para detectar el nivel de angiopoietina 1 y/o angiopoietina 2 en una muestra biológica que comprende poner en contacto a un agente de enlace específico como se describe en la presente con dicha muestra biológica; y determinar el grado de enlace del agente de enlace específico a la muestra. Adicionalmente, se contempla un método para detectar el nivel de angiopoietina 1 y/o angiopoietina 2 en una muestra

biológica que comprende poner en contacto cualquiera de los anticuerpos aquí descritos con dicha muestra biológica; y determinar el grado de enlace del anticuerpo a dicha muestra.

Una modalidad adicional de la invención es un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, la cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO. 2; SEQ ID NO. 3; SEQ ID NO. 4; SEQ ID NO. 5; SEQ ID NO. 6 y, SEQ ID NO. 7; y la cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 8; SEQ ID NO. 9; SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 11; SEQ ID NO. 12; SEQ ID NO. 13; SEQ ID NO. 14; SEQ ID NO. 15; SEQ ID NO. 16 y, SEQ ID NO. 17; así como fragmentos de enlace a antígenos de las mismas. Naturalmente, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos antes descritos y fragmentos de enlace a antígenos también se contemplan.

En otra modalidad, la presente invención se dirige a un anticuerpo aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, la cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y la cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada, el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 7; en

donde el anticuerpo enlaza específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

En una modalidad adicional, la invención es un anticuerpo aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, la cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y la cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera, el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17; en donde el anticuerpo enlaza específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

En una modalidad adicional, la invención se dirige a un anticuerpo aislado que comprende una cadena pesada y cadena ligera, la cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y la cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende 1, 2, o 3CDRs de cadena pesada seleccionadas del grupo de CDRs de HC que consiste de SEQ ID NOs: 18, 26, 28, 32, 34, 35, 37, 38 y, 39, y en donde el anticuerpo enlaza específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

En otra modalidad, la invención se dirige a un anticuerpo aislado el cual comprende una cadena ligera y una

cadena pesada, en donde la cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y la cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde el dominio variable de cadena ligera comprende 1, 2, o 3, CDRs de cadena ligera seleccionados del grupo de CDRs de LC que consisten de SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23, 27, 33, 36, 40, y en donde el anticuerpo enlaza específicamente a al menos uno de los ligandos de Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

En una modalidad adicional, la invención es un anticuerpo aislado el cual comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y la cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende 3 CDRs de cadena pesada (HC) y dicho dominio variable de cadena ligera comprende 3 CDRs de cadena ligera (LC), en donde las secuencias de las CDRs de HC y LC del anticuerpo están seleccionadas del grupo que consiste de:

(a) SEQ ID NOs: 18, 26, 32 de la HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 de la LC,

(b) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 de la LC,

(c) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NOs: 20, 27, 36 de la LC,

(d) SEQ ID NOs: 18, 26, 37 de la HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 de la LC,

(e) SEQ ID NOs: 18, 26, 38 de la HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 de la LC,

(f) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 de la LC,

(g) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NOs: 21, 27, 33 de la LC,

(h) SEQ ID NOs: 18, 28, 39 de la HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 de la LC,

(i) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NOs: 22, 27, 33 de la LC,

(j) SEQ ID NOs: 18, 26, 32 de la HC más SEQ ID NOs: 22, 27, 33 de la LC,

(k) SEQ ID NOs: 18, 29, 39 de la HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 de la LC,

(l) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NOs: 23, 27, 33 de la LC,

(m) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NOs: 20, 27, 40 de la LC,

(n) SEQ ID NOs: 18, 26, 32 de la HC más SEQ ID NOs: 21, 27, 33 de la LC,

(o) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NOs: 24, 27, 33 de la LC,

(p) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NOs: 21, 27, 33 de la LC,

(q) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NOs: 23, 27, 33 de la LC,

(r) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NOs: 20, 30, 33 de la LC,

(s) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NOs: 25, 27, 33 de la LC,

(t) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 de la HC más SEQ ID NOs: 20, 30, 33 de la LC,

(u) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NOs: 20, 27, 40 de la LC, y

(v) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 de la HC más SEQ ID NOs: 20, 31, 33 de la LC;

en donde el anticuerpo enlaza específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

La presente invención también se dirige a un anticuerpo que tiene una cadena pesada y cadena ligera, donde la cadena ligera tiene un dominio variable de cadena ligera que tiene tres CDRs de LC de cualesquiera de (a) a la (v), *supra*, en donde el anticuerpo enlaza específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

Adicionalmente, la presente invención también se dirige a un anticuerpo que tiene una cadena pesada y cadena ligera, donde la cadena pesada tiene un dominio variable de cadena pesada que tiene tres CDRs de HC de cualesquiera de (a) a (v), *supra*, en donde el anticuerpo enlaza específicamente a

al menos uno de los ligandos de Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anticuerpos antes mencionados y fragmentos de enlace a antígenos de los mismos también se contemplan. Otras modalidades de esta invención serán fácilmente evidentes a partir de la descripción aquí proporcionada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 describe una gráfica de tamaño de tumor (eje "y") contra tiempo (eje "x") en ratones que llevan tumores tratados ya sea con un anticuerpo anti-Ang1/2 (H4L4, H4L11, o H6L7) de la invención o un pepticuerpo de control altamente potente (AMG 386) o anticuerpo 536, en comparación con el tratamiento un anticuerpo de control de isotipo. Los detalles se describen en los ejemplos.

La Figura 2 detalla la carga de tumor (% viable de tumor [sección en dos secciones] x peso del tumor) en ratones que llevan tumores tratados con un anticuerpo anti-Ang1/2 (H4L4, H4L11, o H6L7) de la invención o un pepticuerpo de control altamente potente (AMG 386) o anticuerpo 536 comparado con el tratamiento con un anticuerpo de control de isotipo. Los detalles se describen en los ejemplos.

La Figura 3 detalla el efecto de H4L4, H4L11, y H6L7 de la invención, un pepticuerpo de control altamente potente

(AMG 386) y anticuerpo 536 en la proliferación de células endoteliales en ratones que llevan tumores Colo205. Los detalles se describen en los ejemplos.

La Figura 4 detalla la relación de la respuesta a la dosis del anticuerpo H4L4 en ratones que llevan tumores Colo205. Los detalles se describen en los ejemplos.

La Figura 5 detalla el efecto del anticuerpo H4L4 en la carga de tumor Colo205 in vivo. Los detalles se describen en los ejemplos.

La Figura 6 detalla el efecto del anticuerpo H4L4 en la proliferación de células endoteliales en ratones que llevan tumores Colo205. Los detalles se describen en los ejemplos.

La Figura 7 detalla que el mL4-3 administrado sistémicamente neutraliza la fosforilación de Tie2 inducida por Ang1 en los pulmones de ratones. Ratones (n = 3 por grupo) se trataron con L1-7(N) (2 mg/kg), mL4-3 (20 mg/kg) o control Fc (20 mg/kg) diariamente durante 23 días previo a la prueba de estimulación intravenosa con Ang1 o BSA. Se cosecharon posteriormente los pulmones de los ratones, y se determinaron los niveles del Tie2 fosforilado por análisis de inmunoprecipitación-Western blot. Los datos son valores medios ± SE. $*P = 0.0005$ vs Ang1 más Fc, ANOVA con prueba de Fisher después del experimento.

La Figura 8 detalla la inhibición farmacológica de Ang1 durante la organogénesis temprana que altera el desarrollo

del corazón. **A)** Embriones de ratón expuestos a 300 mg/kg mL4-3 (panel derecho) tuvieron corazones más pequeños con trabéculos menores, más estrechos, y más ampliamente espaciados con relación a los corazones más grandes con trabéculos grandes, amplios, encontrados en embriones que coinciden por etapas expuestos a 300 mg/kg de control Fc (panel izquierdo). Se muestran imágenes representativas. **B)** Incidencia de anormalidades cardiacas en embriones tratados con Fc- y mL4-3. $*P < 0.0001$ vs Fc, prueba chi cuadrada.

La Figura 9 detalla el efecto de la inhibición combinada de Ang1 y Ang2 en el crecimiento de los xenoinjertos de tumor Colo205. Ratones (n = 10 por grupo) se implantaron con las células Colo205, y el tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 500 mm^3 con control Fc (5.2 mg/kg QD), mL4-3 (3.2 mg/kg QD), L1-7(N) (2.0 mg/kg QD), L1-7(N) combinado con mL4-3 (a los mismos regímenes de dosificación usados en los grupos con agente sencillo), o AMG 386 (5.6 mg/kg dos veces por semana). Se muestra uno de cuatro experimentos representativos. Los datos son valores medios ± SE. $*P < 0.0001$ vs L1-7(N), RMANOVA con la prueba Scheffé posterior al experimento.

La Figura 10 detalla el efecto del antagonismo de Ang1 y Ang2 sobre la proliferación de células endoteliales de tumor, angiogénesis de la córnea, y angiogénesis de la retina. **A)** El efecto de la inhibición de Ang1 y Ang2 sobre la absorción

de BrdU en células endoteliales de ratón derivadas de xenoinjertos de tumor Colo205. Se trataron ratones que llevaban tumores durante 3 días con Fc (5.7 mg/kg QD), AMG 386 (6 mg/kg dosis sencilla), L1-7(N) (2.2 mg/kg QD), mL4-3 (3.5 mg/kg QD), o L1-7(N) combinado con mL4-3 (a las mismas dosis y programas usados en los grupos con agentes sencillos). Cada barra representa relaciones medias de relaciones BrdU de células de ratón endoteliales:totales (n = 3). Los datos son valores medios ± SE. $^{*}P < 0.05$ vs. Fc, prueba t de Student sin pares. **B y C)** El efecto de la inhibición de Ang1 y Ang2 sobre **(B)** angiogénesis de córnea inducida por VEGF y **(C)** inducida por bFGF. La angiogénesis fue inducida al implantar discos de nylon remojados en VEGF- o bFGF dentro del estroma de la córnea de las ratas (n = 8 por grupo). El tratamiento se inició un día antes del implante de córnea y continuó cada 3 días con: Fc (60 mg/kg), L1-7(N) (5 mg/kg), mL4-3 (60 mg/kg) y L1-7(N) combinado con mL4-3 (a la misma dosis y programa usados en los grupos de agente sencillo). Los datos son valores medios ± SE. $^{\dagger}P < 0.0001$ vs Fc + VEGF **(B)**; $^{\#}P < 0.002$ vs Fc + bFGF **(C)**, ANOVA con prueba de Fisher después del experimento. **D)** La inhibición de Ang2 evita la neovascularización inducida por oxígeno en la retina de ratón. Al iniciar en el día P8 posterior al nacimiento, los cachorros (n = 5 por grupo) se trataron diariamente s.c. durante nueve días con Fc (200

mg/kg) L1-7(N) (100 mg/kg) mL4-3 (100 mg/kg) o L1-7(N) combinado con mL4-3 (a la misma dosis y programa usados en los grupos de agente sencillo). Los datos son valores medios ± SE. $^{\S}P < 0.0001$ vs Fc, ANOVA con prueba de Fisher después del experimento.

La Figura 11 detalla los inhibidores Ang1 y Ang2 que suprimen cooperativamente la angiogénesis folicular de los ovarios. HCG se usó para inducir la superovulación en ratones. Se evaluaron Fc (300 mg/kg), mL4-3 (150 mg/kg), L1-7(N) (150 mg/kg), o una combinación mL4-3/L1-7(N) (150 mg/kg cada uno) administrado por vía s.c. (n = 7-10 ratones por grupo) para la capacidad de evitar la neovascularización en los folículos de ovulación. El área de los vasos sanguíneos fue calculada a partir de secciones inmunoteñidas de anti-CD31 de folículos individuales. Los datos son valores medios ± SE. Se muestran dos experimentos independientes. $^{*}P = 0.005$ comparando la combinación de mL4-3/L1-7(N) vs cualquier agente sencillo solo; $^{\#}P < 0.05$ vs Fc, ANOVA con prueba de Dunnett después del experimento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los encabezados de sección se usan en la presente para propósitos organizativos únicamente, y no son para construirse de ninguna manera para limitar la materia objeto descrita.

Las técnicas estándar pueden usarse para la molécula de ADN recombinante, proteína, y producción de anticuerpo, así como para transformación de célula y cultivo de tejido. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan típicamente de acuerdo a las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica usando procedimientos convencionales tales como aquellos establecidos en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989]), o como se describe en la presente. Se proporcionan las definiciones menos específicas, la nomenclatura utilizada en conexión con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritos en la presente son aquellos bien conocids y usados comúnmente en la técnica. Las técnicas estándares pueden usarse para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y tratamiento de pacientes.

Los términos usados para describir la presente invención, a menos que se definan específicamente en la presente, deberán tener su significado como se entiende y usa en la técnica.

Deberá notarse que los términos H5 y H5P se usan intercambiablemente y se refieren a la cadena pesada usada en

varias modalidades de la invención, por ejemplo, mAb nombrados como H5L7, H5L6, H5L8, H5L4, H5L11, H5L1, H5L12, y H5L9.

El término "Ang-2" se refiere al polipéptido establecido en la Figura 6 de la Patente de E.U.A. No. 6,166,185 ("ligando-2 Tie-2"), incorporada en la presente como referencia, o fragmentos del mismo así como polipéptidos relacionados que incluyen variantes alélicas, variantes de empalme, derivados, variantes de sustitución, eliminaciones, e/o inserción, péptidos de fusión y polipéptidos, y homólogos de interespecie. El polipéptido Ang-2 puede o no puede incluir residuos terminales adicionales, por ejemplo, secuencias líderes, secuencias dirigidas, metionina de terminal amino, residuos de lisina y metionina de terminal amino, y/o secuencias de proteínas de fusión o etiqueta, dependiendo de la manera en la cual se prepara.

El término "agente enlazado específico" se refiere a una molécula, preferiblemente una molécula proteínica, que enlaza Ang-2 así como Ang-1 (y variantes y derivados del mismo como se define en la presente) con una afinidad mayor que otras angiopoietinas. Un agente enlazado específico puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, o compuesto de peso molecular pequeño que enlaza preferencialmente a Ang-2 y Ang-1. En una modalidad preferida, el agente enlazado específico de acuerdo con la

presente invención es un anticuerpo, tal como un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en inglés), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado CDR, un anticuerpo específico múltiple, un anticuerpo bi-específico, un anticuerpo catalítico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id), y anticuerpos que pueden etiquetarse en forma soluble o de enlace, así como fragmentos enlazados al antígeno, variantes o derivados del mismo, ya sea solo o en combinación con otras secuencias de aminoácidos, proporcionadas por técnicas conocidas. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a desdoblamiento enzimático, desdoblamiento químico, síntesis de péptido o técnicas recombinantes. Los agentes enlazado específicos anti-Ang-2 y Ang-1 de la presente invención son capaces de enlazar porciónes de Ang-2 y Ang-1 que modulan, por ejemplo, inhiben o promueven, la actividad biológica de Ang-2 y Ang-1 y/o otras actividades asociadas con Ang-2 y Ang-1.

El término "anticuerpo policlonal" se refiere a una mezcla heterogénea de anticuerpos que reconocen y enlazan a diferentes epítopos en el mismo antígeno. Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse de preparaciones de suero crudas o pueden purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de afinidad de antígeno, o cromatografía de afinidad de Proteína A/Proteína G.

El término "anticuerpos monoclonales" se refiere a una colección de anticuerpos codificados por la misma molécula de ácido nucleico que se producen opcionalmente por un hibridoma sencillo (o clon del mismo) u otra línea celular, o por un mamífero transgénico de tal manera que cada anticuerpo monoclonal típicamente reconocerá el mismo epítopo en el antígeno. El término "monoclonal" no se limita a cualquier método particular para hacer el anticuerpo, ni el término se limita a anticuerpos producidos en una especie particular, *por ejemplo,* ratón, rata, etc.

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a una secuencia correspondiente en derivados de anticuerpo de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las cadenas son idénticas con u homólogas a una secuencia correspondiente en derivados de anticuerpo de otra especie o que pertenece a otra clase u subclase de anticuerpo. También se incluyen fragmentos enlazados al antígeno de tales anticuerpos que muestran la actividad biológica deseada (esto es, la capacidad para enlazar específicamente Ang-2). *Ver,* la Patente de E.U.A. No. 4,816,567 y Morrison *et al., Proc Natl Acad Sci (USA),* 81:6851-6855 [1985].

El término "Anticuerpo injertado en CDR" se refiere a un

anticuerpo en el cual la CDR de un anticuerpo de una especie o isotipo particular se inserta recombinantemente en la estructura de otro anticuerpo de la misma o diferente especie o isotipo.

El término "anticuerpo específico múltiple" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables que reconocen más de un epítopo en uno o más antígenos. Una subclase de este tipo de anticuerpo es un "anticuerpo bi-específico" que reconoce dos epítopos distintos en los mismos o diferentes antígenos.

Los anticuerpos "catalíticos" se refiere a anticuerpos en donde una o más porciones citotóxicas, o más generalmente una o más biológicamente activas se unen al agente enlazado dirigido.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo específico de anticuerpo injertado CDR en el cual la región de estructura de anticuerpo se deriva de un humano pero cada CDR se reemplaza con aquel derivado de otra especie, tal como un CDR de murino. El término "CDR" se define *infra*.

El término anticuerpo "completamente humano" se refiere a un anticuerpo en el cual tanto la CDR como la estructura se derivan de una o más moléculas de ADN humanas.

El término anticuerpo "anti-idiotipo" se refiere a cualquier anticuerpo que enlaza específicamente a otro anticuerpo que reconoce un antígeno. La producción de

anticuerpos anti-idiotipos puede realizarse por cualquiera de los métodos descritos en la presente para la producción anticuerpos específicos de Ang-2 excepto que estos anticuerpos surgen de *por ejemplo,* inmunización de un animal con un anticuerpo específico de Ang-2 o fragmento enlazado a Ang-2 del mismo, en vez de polipéptido Ang-2 por sí mismo o un fragmento del mismo.

El término "variantes," como se usa en la presente, incluye aquellos polipéptidos en donde los residuos de aminoácido se insertan en, eliminan de y/o sustituyen en la secuencia de aminoácidos que se presenta naturalmente (o al menos una conocida) para el agente enlazado. Las variantes de la invención incluyen proteínas de fusión como se describen a continuación.

"Derivados" incluyen aquellos agentes enlazados que se han modificado químicamente de alguna manera distinta de las variantes de inserción, eliminación, o sustitución.

"Enlazado específicamente" se refiere a la capacidad de un agente enlazado específico (tal como un anticuerpo o fragmento del mismo) de la presente invención para reconocer y enlazar el polipéptido objetivo maduro, de longitud parcial o longitud completa (aquí Ang-2 y Ang-1), o un ortólogo del mismo, de tal manera que su afinidad (como se determina por, *por ejemplo,* ensayos BIAcore o ELISA de afinidad como se describen en la presente) o su capacidad de neutralización

(como se determina por, *por ejemplo,* ensayos ELISA de Neutralización descritos en la presente, o ensayos similares) es al menos 10 veces mayor, pero opcionalmente 50 veces mayor, 100, 250 ó 500 veces mayor, o aún al menos 1000 veces mayor que la capacidad de afinidad o neutralización del mismo para cualquiera otra angiopoietina u otro péptido o polipéptido.

El término "dominio enlazado al antígeno" o "región enlazada al antígeno" se refiere a aquella porción del agente enlazado específico (tal como una molécula de anticuerpo) que contiene los residuos de aminoácido del agente enlazado específico (u otras porciones) que interactúan con un antígeno y que confieren en el antígeno enlazado su especificidad y afinidad para el antígeno. En un anticuerpo, el dominio enlazado al antígeno se refiere comúnmente como la "región que determina la complementariedad, o CDR."

El término "epítopo" se refiere a tal porción de cualquier molécula capaz de reconocerse por y enlazarse por un agente enlazado específico, *por ejemplo* un anticuerpo, en una o más de las regiones enlazadas del antígeno del agente enlazado. Los epítopos usualmente consisten de agrupaciones de superficie activa químicamente de moléculas, tal como por ejemplo, cadenas laterales de aminoácidos o carbohidrato, y tienen características estructurales tridimensionales

específicas así como características de carga específicas. Los epítopos como se usa en la presente pueden ser contiguos o no contiguos. Por lo tanto, los epítopos pueden ser miméticos en que comprenden una estructura tridimensional que es idéntica al epítopo usado para generar el anticuerpo, aún comprende ninguno o solamente algunos de los residuos de aminoácido encontrados en el Ang-2 usado para estimular la respuesta inmune del anticuerpo.

El término "epítopo inhibido y/o neutralizador" es un epítopo, que cuando se enlaza por un agente enlazado específico tal como un anticuerpo, resulta en la pérdida de (o al menos la disminución en) actividad biológica de la molécula, célula, u organismo que contiene tal epítopo, *in vivo*, *in vitro*, o *in situ*. En el contexto de la presente invención, el epítopo neutralizador se localiza en o se asocia con una región biológicamente activa de Ang-2. Alternativamente, el término "epítopo activado" es un epítopo, que cuando se enlaza por un agente enlazado específico de la invención, tal como un anticuerpo, resulta en activación, o al menos mantenimiento de una conformación biológicamente activa, de Ang-2.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de un anticuerpo completo, intacto. Los anticuerpos completos comprenden dos partes o fragmentos funcionalmente independientes: un

fragmento enlazado al antígeno conocido como "Fab," y un fragmento cristalizable de terminal carboxi conocido como el fragmento "Fc". El fragmento Fab incluye el primer dominio constante de tanto la cadena pesada como ligera (CH1 y CL1) junto con las regiones variables de tanto las cadenas pesadas como ligeras que enlazan el antígeno específico. Cada una de las regiones variables de cadena ligera y pesada incluye tres regiones que determinan la complementariedad (CDR) y residuos de aminoácido de la estructura que separan los CDR individuales. La región Fc comprende las regiones constantes de segunda y tercera cadena pesada (CH2 y CH3) y se involucra en funciones efectoras tal como activación del complemento y ataque por células fagocíticas. En algunos anticuerpos, las regiones Fc y Fab se separan por un anticuerpo "región de bisagra," y dependiendo de cómo el anticuerpo de longitud completa se desdobla proteolíticamente, la región de bisagra puede asociarse con ya sea el fragmento Fab o Fc. Por ejemplo, el desdoblamiento de un anticuerpo con la papaína proteasa resulta en la región de bisagra que se asocia con el fragmento Fc resultante, mientras que el desdoblamiento con la pepsina proteasa proporciona un fragmento en donde la bisagra se asocia con ambos fragmentos Fab simultáneamente. Debido a que los dos fragmentos Fab están de hecho ligados covalentemente siguiendo el desdoblamiento de pepsina, el fragmento resultante se nombra el fragmento F(ab')2.

Un dominio Fc puede tener una vida media de suero largo relativamente, mientras que un Fab es de corta duración. [Capon *et al.*, Nature, 337: 525-31 (1989)] Cuando se expresa como parte de una proteína de fusión, un dominio Fc puede impartir vida media más larga o incorporar tales funciones como el enlace del receptor Fc, enlace de la Proteína A, fijación del complemento y quizás aún transferencia de placenta en la proteína a la cual se fusiona. La región Fc puede ser una región Fc que se presenta naturalmente, o puede alterarse para mejorar ciertas cualidades, tal como cualidades terapéuticas o tiempo de circulación.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere a una porción de las cadenas ligera y/o pesada de un anticuerpo, típicamente incluyendo aproximadamente los aminoácidos 120 hasta 130 de terminal amino en la cadena pesada y alrededor de 100 hasta 110 aminoácidos de terminal amino en la cadena ligera. Las regiones variables típicamente difieren extensivamente en la secuencia de aminoácidos aún entre los anticuerpos de la misma especie. La región variable de un anticuerpo típicamente determina el enlace y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad en secuencia se concentra en aquellas regiones referidas como regiones que determinan la complementariedad (CDR), mientras que las regiones conservadas más altamente en el dominio variable se

llaman regiones de estructura (FR). Las CDR de las cadenas ligera y pesada contenidas dentro de los aminoácidos que son responsables en gran parte para la interacción directa del anticuerpo con el antígeno, sin embargo, los aminoácidos en las FR pueden afectar significativamente el enlace/reconocimiento del antígeno como se discute en la presente *infra*.

El término "cadena ligera" cuando se usa en referencia a un anticuerpo colectivamente se refiere a dos tipos distintos, nombrados kappa (k) o lambda (l) con base en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes.

El término "cadena pesada" cuando se usa en referencia a un anticuerpo colectivamente se refiere a cinco tipos distintos, nombrados alfa, delta, epsilon, gamma y mu, con base en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada. La combinación de cadenas ligera y pesada da elevación hasta cinco clases conocidas de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases conocidas de IgG, designadas como IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4.

El término "que se presenta naturalmente" cuando se usa en conexión con materiales biológicos tal como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospederas, y los similares, se refiere a aquellos que se encuentran en la naturaleza y no se modifican por un ser humano.

El término "aislado" cuando se usa en relación a Ang-2 o a un agente enlazado específico de Ang-2 se refiere a un compuesto que está libre de al menos un polipéptido o compuesto contaminante que se encuentra en su ambiente natural, y preferiblemente sustancialmente libre de cualquiera de otros polipéptidos mamíferos contaminantes que deberán interferir con sus uso terapéutico o de diagnostico.

El término "maduro" cuando se usa en relación al anticuerpo Ang-2, anti-Ang-2, o a cualquiera agente enlazado específico proteínico de Ang-2 se refiere a un péptido o un polipéptido que carece de una secuencia líder o de señal. Cuando un agente enlazado de la invención se expresa, por ejemplo, en una célula hospedera procariótica, el péptido o polipéptido "maduro" también puede incluir residuos de aminoácido adicionales (pero todavía carece de una secuencia líder) tal como una metionina de terminal amino, o uno o más residuos de metionina y lisina. Un péptido o polipéptido producido de esta manera puede utilizarse con o sin estos residuos de aminoácido adicionales que se han removido.

Agentes de enlace específicos y Anticuerpos

Como se usa en la presente, el término "agente de enlace específico" se refiere a una molécula que tiene especificidad para reconocer y enlazar Ang-2 y Ang-1, como se describe en la presente. Los agentes de enlace específicos adecuados

incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y derivados de los mismos, polipéptidos, y moléculas pequeñas. Los agentes de enlace específicos adecuados pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica. Un agente de enlace específico de polipéptido Ang-2 y Ang-1 ejemplar de la presente invención es capaz de enlazar una cierta porción de los polipéptidos Ang-2 y Ang-1, y preferiblemente modular la actividad o función de los polipéptidos Ang-2 y Ang-1.

Los agentes de enlace específicos tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que enlazan específicamente polipéptidos Ang-2 y Ang-1 están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser policlonales incluyendo mono-policlonal específico, monoclonal (mAbs), recombinante, quimérico, humanizado tal como injertado CDR, humano, cadena sencilla, catalítico, específico múltiple y/o bi-específico, así como fragmentos enlazados al antígeno, variantes, y/o derivados de los mismos.

Los anticuerpos policlonales contra polipéptidos Ang2 y Ang1 generalmente se producen en animales (*por ejemplo*, conejos, hámsteres, cabras, ovejas, caballos, cerdos, ratas, jerbos, conejillos de indias, ratones, o cualquier otro mamífero adecuado, así como otra especies no mamíferas) por medio de inyecciones intraperitoneales o subcutáneas múltiples de polipéptido Ang-2 y/o Ang-1 o un fragmento de los mismos con o sin un adyuvante. Tales adyuvantes

incluyen, pero no se limitan a, geles minerales, completos e incompletos de Freund tal como hidróxido de aluminio, y sustancias activas de la superficie tal como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa, y dinitrofenol. El BCG (bacilli Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum son adyuvantes humanos potencialmente útiles. Pueden ser útiles para conjugar un polipéptido de antígeno a una proteína portadora que es inmunogénica en la especie para inmunizarse, tal como hemocianina de lapa, suero, albumina, tiroglobulina de bovino, o inhibidor de tripsina de fríjol de soya. También, agentes agregados tal como alum se usan para potenciar la respuesta inmune. Después de la inmunización, los animales se hacen sangrar y el suero se procesa por ensayo para la titulación del anticuerpo de polipéptido anti-Ang-2 que puede determinarse usando los ensayos descritos en la presente bajo "Ejemplos". Los anticuerpos policlonales pueden utilizarse en los sueros de los cuales se detectaron, o pueden purificarse de los sueros, usando, por ejemplo, cromatografía de afinidad de antígeno o cromatografía de afinidad de Proteína A o G.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia polipéptidos Ang-2 pueden producirse usando, por ejemplo pero sin limitación, el método "hibridoma" tradicional o la técnica de "despliegue de fagos" más nueva. Por ejemplo, los

anticuerpos monoclonales de la invención pueden hacerse por el método de hibridoma como se describe en Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 [1975]; la técnica de hibridoma de célula B humana [Kosbor *et al.*, *Immunol Today* 4:72 (1983); Cote *et al.*, *Proc Natl Acad Sci (USA)* 80: 2026-2030 (1983); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)] y la técnica de hibridoma EBV [Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96, (1985)]. También proporcionado por la invención son líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con polipéptidos Ang-2.

Cuando la técnica de hibridoma se emplea, las líneas celulares de mieloma pueden usarse. Tales líneas celulares adecuadas para uso en procedimiento de fusión que producen hibridoma preferiblemente están producidas sin anticuerpo, tienen eficiencia de fusión alta, y deficiencias de enzima que las hace incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de solamente las células fusionadas deseadas (hibridomas). Por ejemplo, las líneas celulares usadas en fusiones de ratón son Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 41, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; líneas celulares usadas en fusiones de ratas son R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para fusiones celulares son U-

266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6. Los hibridomas y otras líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales se contemplan para ser composiciones novedosas de la presente invención.

La técnica de despliegue de fagos también puede usarse para generar anticuerpos monoclonales de cualquier especie. Preferiblemente, esta técnica se usa para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos en los cuales un polinucleótido que codifica un fragmento de anticuerpo Fab o Fv sencillo se expresa en la superficie de una partícula de fago. [Hoogenboom *et al.*, *J Mol Biol* 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J Mol Biol* 222: 581 (1991); *ver* también la Patente de E.U.A. No. 5,885,793)]. Cada fago puede "separarse por exclusión" usando ensayos enlazados descritos en la presente para identificar estos fragmentos de anticuerpo que tienen afinidad para Ang-2. De esta manera, estos procesos de selección inmune imitadora a través de la exhibición de los repertorios del fragmento de anticuerpo en la superficie del bacteriófago filamentoso, y selección posterior del fago por su enlace a Ang-2. Tal procedimiento se describe en la Solicitud PCT No. PCT/US98/17364, presentada en el nombre de Adams *et al.*, que describe el aislamiento de la afinidad alta y fragmentos de anticuerpo agonísticos funcionales para receptores MPL y msk usando tal enfoque. En este enfoque, un repertorio completo de los genes del anticuerpo humano puede

crearse al clonar genes V humanos reconfigurados naturalmente de linfocitos de sangre periférica como se describe previamente [Mullinax *et al., Proc Natl Acad Sci (USA) 87*: 8095-8099 (1990)].

Una vez que las secuencias de polinucleótido se identifican que codifican cada cadena del anticuerpo monoclonal de longitud completa o los fragmentos Fab o Fv de la invención, células hospederas, ya sea eucarióticas o procarióticas, pueden usarse para expresar los polinucleótidos de anticuerpo monoclonal usando técnicas recombinantes bien conocidas y practicadas de manera rutinaria en la técnica. Alternativamente, los animales transgénicos se producen en donde un polinucleótido que codifica el agente de enlace específico deseado se introduce en el genoma de un animal receptor, tal como, por ejemplo, un ratón, conejo, cabra, o vaca, en una manera que permite la expresión de las moléculas de polinucleótido que codifican un anticuerpo monoclonal u otro agente de enlace específico. En un aspecto, los polinucleótidos que codifican el anticuerpo monoclonal u otro agente de enlace específico pueden ligarse a secuencia reguladoras específicas mamarias, y los polinucleótidos quiméricos pueden introducirse en la línea germinal del animal objetivo. El animal transgénico resultante luego produce el anticuerpo deseado en su leche [Pollock *et al., J Immunol Meth* 231:147-157 (1999); Little *et*

al., *Immunol Today* 8:364-370 (2000)]. Además, las plantas pueden usarse para expresar y producir agentes de enlace específicos Ang-2 tal como anticuerpos monoclonales al transfectar plantas adecuadas con los polinucleótidos que codifican los anticuerpos monoclonales u otros agentes de enlace específicos.

En otra modalidad de la presente invención, un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento del mismo que se deriva de otro diferente de una especie humana pueden "humanizarse" o "quimerizarse". Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. (*ver Patente de E.U.A.* Nos. 5,859,205, 5,585,089, y 5,693,762). La humanización se realiza, por ejemplo, usando métodos descritos en la técnica [Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988)] al sustituir al menos una porción de, por ejemplo una región que determina la complementariedad (CDR) de roedor para las regiones correspondiente de un anticuerpo humano. La invención también proporciona variantes y derivados de estos anticuerpos humanos como se discute en la presente y conoce bien en la técnica.

También se abarcan por la invención anticuerpos completamente humanos que enlazan polipéptidos Ang-2, así como, fragmentos enlazados al antígeno, variantes y/o

derivados de los mismos. Tales anticuerpos pueden producirse usando la técnica de despliegue de fagos descrita arriba. Alternativamènte, los animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en la ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena puede usarse para generar tales anticuerpos. Esto puede realizarse por inmunización del animal con el antígeno Ang-2 o fragmentos del mismo donde los fragmentos Ang-2 tienen una secuencia de aminoácidos que es única para Ang-2. Tales inmunogenos pueden conjugarse opcionalmente a un portador. *Ver*, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno*, 7: 33 (1993). En un método, tales animales transgénico se producen al incapacitar la ubicación endógena que codifica las cadenas inmunoglobulina ligera y pesada en ellos, e insertar la ubicación que codifica las proteínas de cadena ligera y pesada humana en el genoma de la misma. Los animales modificados parcialmente, que son aquellos que tienen menos del complemento completo de estas modificaciones, luego se cruzan para obtener un animal que tiene todas de las modificaciones del sistema inmune deseado. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos son capaces de producir anticuerpos con regiones variables humanas, incluyendo secuencias de aminoácidos

humanas (en vez de *por ejemplo*, murino), que son inmuno-específicos para los antígenos deseados. *Ver* solicitud PCT Nos., PCT/US96/05928 y PCT/US93/06926. Los métodos adicionales se describen en la Patente de E.U.A. No. 5,545,807, solicitud PCT Nos. PCT/US91/245, PCT/GB89/01207, y en EP 546073B1 y EP 546073A1. Los anticuerpos humanos también pueden producirse por la expresión de ADN recombinante en células hospederas o por la expresión en células de hibridoma como se describe en la presente.

La transgenesis se alcanza en un número de formas diferentes. Ver, por ejemplo, Bruggeman *et al., Immunol Today* 17:391-7 (1996). En un enfoque, una miniubicación se construye de tal manera que los segmentos del gen en una configuración de la línea germinal se llevan artificialmente cerca una de la otra. Debido a las limitaciones de tamaño (esto es, que tienen generalmente menos de 30 kb), la miniubicación resultante contendrá un número limitado de segmento del gen diferido, pero todavía es capaz de producir un repertorio grande de anticuerpos. La miniubicación que contiene solamente secuencias de ADN humanas, incluyendo promotores y potenciadores son completamente funcionales en los ratones transgénicos.

Cuando un número más grande de segmentos del gen se desean en el animal transgénico, se utilizan cromosomas artificiales de levadura (YAC). Los YAC pueden estar en el

intervalo de varios cientos de kilobases hasta 1 Mb y se introducen en el genoma del ratón (u otro animal apropiado) por medio de microinyección directamente en un huevo o por medio de la transferencia del YAC en las líneas celulares del tallo embriónico (ES). En general, los YAC se transfieren en células ES por lipofección del ADN purificado, o fusión del esferoplasto de levadura en donde el ADN purificado se lleva a cabo en micelas y la fusión se lleva a cabo en una manera similar a los protocolos de fusión del hibridoma. La selección de las células ES deseadas después de la transferencia de ADN se realiza al incluir en el YAC cualquiera de los marcadores seleccionables conocidos en la técnica.

Como otra alternativa, los vectores P1 de bacteriófago se usan los cuales se amplifican en un hospedero E. coli bacteriano. Mientras que estos vectores generalmente portan menos ADN insertado que un YAC, los clones se hacen crecer fácilmente en rendimiento sùficientemente alto para permite la microinyección directa en un huevo de ratón. El uso de un coctel de vectores P1 diferentes se ha mostrado para llevar a niveles altos de la recombinación homóloga.

Una vez que un ratón transgénico apropiado (u otro animal apropiado) se ha identificado, usando cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para detectar niveles de suero de un anticuerpo circulante (*por ejemplo*, ELISA), el

animal transgénico se cruza con un ratón en el cual la ubicación Ig endógena se ha interrumpido. El resultado proporciona progenie en donde esencialmente todas las células B expresan anticuerpos humanos.

Todavía como otra alternativa, la ubicación Ig del animal completo se reemplaza con la ubicación Ig humana, en donde el animal resultante expresa solamente anticuerpos humanos. En otro enfoque, las porciones de las ubicaciones del animal se reemplazan con regiones específicas y correspondientes en las ubicaciones humanas. En ciertos casos, los animales que resultan de este procedimiento pueden expresar anticuerpos quiméricos, como se oponen a los anticuerpos completamente humanos, dependiendo de la naturaleza del reemplazo en la ubicación Ig de ratón.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse al exponer esplenocitos humanos (células B o T) a un antígeno *in vitro*, luego reconstruyendo las células expuestas en un ratón inmunocomprometido, *por ejemplo* SCID o nod/SCID. *Ver* Brams *et al., J Immunol,* 160: 2051-2058 [1998]; Carballido *et al., Nat Med*, 6: 103-106 [2000]. En un enfoque, el injerto de tejido fetal humano en ratones SCID (SCID-hu) resulta en hematopoyesis de larga duración y desarrollo de célula T humana [McCune *et al., Science 241*:1532-1639 (1988); Ifversen *et al., Sem Immunol* 8:243-248 (1996)]. Cualquier respuesta inmune humoral en estos ratones quiméricos es dependiente

completamente en el co-desarrollo de células T en los animales [Martensson *et al., Immunol 83*:1271-179 (1994)]. En un enfoque alternativo, los linfocitos de sangre periférica humana se transplantan intraperitonealmente (o de otra manera) en ratones SCID [Mosier *et al., Nature* 335:256-259 (1988)]. Cuando las células transplantadas se tratan con cualquier agente cebado, tal como Enterotoxina A de Estafilococos (SEA) [Martensson *et al., Immunol 84*: 224-230 (1995)], o anticuerpos monoclonales CD40 anti-humanos [Murphy *et al., Blood* 86:1946-1953 (1995)], niveles superiores de producción de célula B se detectan.

Alternativamente, un repertorio de cadena pesada humana sintética completamente se crea de los segmentos del gen V no reconfigurados al ensamblar cada segmento VH humano con segmentos D de nucleótidos aleatorios junto con un segmento J humano [Hoogenboom *et al., J Mol Biol 227*:381-388 (1992)]. Similarmente, un repertorio de cadena ligera se construye al combinar cada segmento V humano con un segmento J [Griffiths *et al., EMBO J 13*:3245-3260 (1994)]. Los nucleótidos que codifican el anticuerpo completo (esto es, tanto cadenas ligera como pesada) se ligan como un fragmento Fv de cadena sencilla y este polinucleótido se liga a un nucleótido que codifica un fago filamentoso menor de proteína recubierta. Cuando esta proteína de fusión se expresa en la superficie del fago, un polinucleótido que codifica un anticuerpo

específico se identifica por selección usando un antígeno inmovilizado.

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

La producción a gran escala de anticuerpos quiméricos, humanizados, injertados de CDR, y completamente humanos, o fragmentos enlazados al antígeno de los mismos, se producen típicamente por métodos recombinantes. Las moléculas de polinucleótido que codifican las cadenas ligera y pesada de cada anticuerpo o fragmentos enlazados al antígeno de las mismas, pueden introducirse en células hospederas y expresarse usando materiales y procedimientos descritos en la presente. En una modalidad preferida, los anticuerpos se producen en células hospederas de mamífero, tal como células CHO. Los detalles de tal producción se describen en la presente.

Los agentes de enlace específicos de la presente invención, tal como los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y derivados de anticuerpo de la invención pueden comprender además cualquier región constante conocida en la técnica. La región constante de cadena ligera puede ser, por

ejemplo, una región constante de cadena ligera tipo kappa o lambda, por ejemplo, una región constante de cadena ligera tipo kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada puede ser, por ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada tipo alfa, delta, epsilon, gamma, o mu, por ejemplo, una región constante de cadena pesada tipo alfa, delta, epsilon, gamma, o mu humana. En una modalidad, la región constante de cadena ligera o pesada es un fragmento, derivado, variante, o muteina de una región constante que se presenta naturalmente.

En una modalidad, los agentes de enlace específicos de la presente invención, tal como los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpo de la invención comprenden un IgG.

Las técnicas se conocen para derivar un anticuerpo de una subclase diferente o isotipo de un anticuerpo de interés, esto es, subclase de conmutación. De esta manera, los anticuerpos IgG pueden derivarse de un anticuerpo IgM, por ejemplo, y viceversa. Tales técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades enlazadas al antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo precursor), pero también muestra propiedades biológicas asociadas con un isotipo de anticuerpo o subclase diferente de aquel del anticuerpo precursor. Las tecnologías de ADN recombinante pueden emplearse. Los polipéptidos de anticuerpo particular

que codifican el ADN clonado pueden emplearse en tales procedimientos, por ejemplo, ADN que codifica el dominio constante de un anticuerpo del isotipo deseado. Ver también Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16.

Los agentes de enlace específicos de la presente invención, tal como los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpo de la invención pueden comprender el dominio constante de cadena pesada IgG1 o un fragmento del dominio de cadena pesada IgG1. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpo de la invención pueden comprender además los dominios kappa o lambda de cadena ligera constante o un fragmento de estos. Las regiones constantes de cadena ligera y polinucleótidos codificados a ellas se proporcionan en la presente a continuación. En otra modalidad, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpo de la invención comprenden además un dominio constante de cadena pesada, o un fragmento de los mismos, tal como la región constante de cadena pesada IgG2 también mostrada en la presente a continuación.

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

lambda y los dominios variables kappa pueden fusionarse a dominios constantes kappa.

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

gctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgaga
gcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtg
gaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctcagga
ctctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctaca
cctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatg
ttgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttc
cccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtgg
tggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggt
gcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagc
gtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca
acaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgaga
accacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg
acctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc
agccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctccttcttcct
ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc
gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggta
aatga

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

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF

PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ADN de dominio constante ligera Kappa (SEQ ID NO: 43):
cgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctg
gaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtg
gaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagc
aaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaac
acaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagctt
caacaggggagagtgttag

Proteína de dominio constante ligero Kappa (SEQ ID NO: 44):
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ADN de dominio constante ligero lambda (SEQ ID NO: 45):
ggccaaccgaaagcggcgccctcggtcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaag
ccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggc
ctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaa
agcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtccc
acagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtggcccc
tacagaatgttcatag

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

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ

SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Los agentes de enlace específicos de la presente invención, tal como los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpo de la invención incluye aquellos que comprenden, por ejemplo, las combinaciones de dominio variable H6L7, H5L7, H4L13, H11L7, H4L7, H10L7, H5L6, H2L7, H5L8, H6L8, H3L7, H5L4, H4L12, H6L6, H4L2, H4L6, H4L4, H5L11, H5L1, H4L11, H5L12, H5L9 que tienen un isotipo deseado (por ejemplo, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE, e IgD) así como fragmentos Fab o $F(ab')_2$ de los mismos. Por lo tanto, si un IgG4 se desea, también puede desearse para introducir una mutación de punto en la región de bisagra como se describe en Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407 (incorporada como referencia en la presente) para aliviar una tendencia para formar enlaces de disulfuro de cadena intra-H que pueden llevar a la heterogeneidad en los anticuerpos IgG4.

Información de Secuencia Útil Adicional

Las siguientes secuencias de los isotipos IgG1, IgG2,

IgG3, e IgG4 se usan en combinación con las secuencias de cadena pesada variables de los anticuerpos de la presente invención para hacer un isotipo deseado específico del anticuerpo:

IgG1 humana

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG2 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG3 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDT
PPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRF
TQKSLSLSPGK

IgG4 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFEGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

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

Las siguientes secuencias representan las secuencias de cadena pesada de los anticuerpos de la presente invención como el isotipo IgG2. Las secuencias de cadena ligera permanecen iguales, que se proporcionan en los Ejemplos. Las porciones de secuencia subrayadas representan las secuencias IgG2:

H2

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIEYA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDILTGYGYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H3

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIQYA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDILTGYGYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H6

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDIYTGYGYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H10

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDILTGYGLWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H11

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDILTGYGMWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H4

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDLLTGYGYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H5

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLDYDIWTGYGYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Compañeros de Fusión de los Agentes de enlace específicos

En una modalidad adicional de la invención, los polipéptidos que comprenden los dominios variables de secuencia de aminoácidos de anticuerpos Ang-2, tal como una región variable de cadena pesada con un secuencia de aminoácidos como se describe en la presente o una región variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos como se describe en la presente, puede fusionarse en ya sea la terminal N o la terminal C a uno o más dominios de una

región Fc de IgG humano. Cuando se construyen junto con una proteína terapéutica tal como el Fab de un anticuerpo específico Ang-2, un dominio Fc puede proporcionar la vida media más larga o incorporar tales funciones como el enlace del receptor Fc, enlace de la Proteína A, fijación del complemento y quizás aún transferencia de placenta. [Capon *et al.*, Nature, 337: 525-531 (1989)].

En un ejemplo, la bisagra del anticuerpo, regiones CH2 y CH3 pueden fusionarse en ya sea la terminal N o terminal C de los polipéptidos del agente de enlace específico tal como un fragmento Fab o Fv anti-Ang-2 (obtenidos, por ejemplo, de una colección de despliegue de fagos) usando métodos conocidos para el técnico experimentado. La proteína de fusión resultante puede purificarse por el uso de una columna de afinidad de Proteína A o Proteína G. Los péptidos y proteínas fusionadas a una región Fc se han encontrado para mostrar una vida media mayor sustancialmente *in vivo* que la contraparte no fusionada. También, una fusión a una región Fc se permite para la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc que se presenta naturalmente, o pueden alterarse para mejorar ciertas cualidades, tal como cualidades terapéuticas, tiempo de circulación, problemas de agregación disminuidos, etc. Otros ejemplos conocidos en la técnica incluyen aquellos en donde la región Fc, que puede ser humana o de otra especie, o

puede ser sintética, se fusiona a la terminal N de CD30L para tratar la enfermedad de Hodgkin, linfoma anaplástico y leucemia de célula T (Patente de E.U.A. No. 5,480,981), la región Fc se fusiona al receptor TNF para tratar choque séptico [Fisher *et al.*, N Engl J Med, 334: 1697-1702 (1996)], y la región Fc se fusiona al receptor Cd4 para tratar SIDA [Capon *et al.*, Nature, 337: 525-31 (1989)].

Los anticuerpos catalíticos son otro tipo de molécula de fusión e incluyen anticuerpos a los cuales una o más porciones citotóxicas, o más generalmente una o más biológicamente activas, se unen al agente de enlace específico. Ver, por ejemplo Rader *et al.*, *Chem Eur J* 12:2091-2095 (2000). Los agentes citotóxicos de este tipo mejoran la citotoxicidad mediada por el anticuerpo, e incluyen tales porciones como citoquinas que directamente o indirectamente estimulan la muerte celular, radioisotopos, fármacos quimioterapéuticos (incluyendo profármacos), toxinas bacterianas (por ejemplo exotoxina de pseudomonas, toxina de difteria, etc.), toxinas de planta (por ejemplo ricina, gelonina, etc.), conjugados químicos (por ejemplo, toxinas de maitansinoide, calecaemicina, etc.), radioconjugados, conjugados de enzima (conjugados de ARNsa, terapia de enzima/profármaco dirigida al anticuerpo [ADEPT)]), y los similares. En un aspecto, el agente citotóxico puede "unirse" a un componente de un anticuerpo bi-específico o

específico múltiple por el enlace de este agente a uno de los sitios de reconocimiento al antígeno alternativos en el anticuerpo. Como una alternativa, las citotoxinas de proteína pueden expresarse como proteínas de fusión con el agente de enlace específico seguido de ligación de un polinucleótido que codifica la toxina a un polinucleótido que codifica el agente enlazado. Todavía en otra alternativa, el agente de enlace específico puede modificarse covalentemente para incluir la citotoxina deseada.

Los ejemplos de tales proteínas de fusión son polipéptidos inmunogénicos, proteínas con vidas medias circulantes largas, tal como regiones constantes de inmunoglobulina, proteínas marcadoras, proteínas o polipéptidos que facilitan la purificación del polipéptido de agente de enlace específico deseado, y secuencias de polipéptido que promueven la formación de proteínas multiméricas (tal como porciones de cierre de leucina que son útiles en la formación/estabilidad del dímero).

Este tipo de variante de inserción generalmente tiene todo o una porción sustancial de la molécula nativa, ligada a la terminal N o C, a toda o una porción de un segundo polipéptido. Por ejemplo, las proteínas de fusión típicamente emplean secuencias líderes de otra especie para permitir la expresión recombinante de una proteína en un hospedero heterólogo. Otra proteína de fusión útil incluye

la adición de un dominio inmunológicamente activo, tal como un epítopo de anticuerpo, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. La inclusión de un sitio desdoblado en o cerca de la unión de fusión facilitará la eliminación del polipéptido extraño después de la purificación. Otras fusiones útiles incluyen ligadura de dominios funcionales, tal como sitios activos de enzimas, dominios de glicosilación, señales de direccionamiento celular o regiones de transmembrana.

Existen varios sistemas de expresión de la proteína de fusión comercialmente disponibles que pueden usarse en la presente invención. Los sistemas particularmente útiles incluyen pero no se limitan al sistema de glutationa-S-transferasa (GST) (Pharmacia), el sistema de proteína enlazada a maltosa (NEB, Beverley, MA), el sistema FLAG (IBI, New Haven, CT), y el sistema 6xHis (Qiagen, Chatsworth, CA). Estos sistemas son capaces de producir polipéptidos recombinantes que portan solamente un número pequeño de aminoácidos adicionales, que son improbables para afectar la capacidad antigénica del polipéptido recombinante. Por ejemplo, tanto el sistema FLAG como el sistema 6xHis agregan solamente secuencias cortas, ambas de las cuales se conocen para ser antigénica pobremente y que no afecta adversamente el pliegue del polipéptido para su conformación nativa. Otra fusión de terminal N que se contempla para ser útil es la

fusión de un dipéptido Met-Lys en la región de terminal N de la proteína o péptidos. Tal fusión puede producir incrementos benéficos en la expresión o actividad de la proteína.

Un constructo de fusión particularmente útil puede ser uno en el cual el péptido de agente de enlace específico se fusiona a un hapteno para aumentar la inmunogenicidad de un constructo de fusión de agente de enlace específico que es útil, por ejemplo, en la producción de anticuerpos anti-idiotipo de la invención. Tales constructos de fusión para incrementar la inmunogenicidad son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, una fusión del agente de enlace específico con un antígeno auxiliar tal como hsp70 o secuencias de péptido tal como de cadena de toxina de difteria o una citoquina tal como IL-2 será útil para producir una respuesta inmunitaria. En otras modalidades, el constructo de fusión puede hacerse que aumentará la capacidad de dirigir de las composiciones de agente enlazado al antígeno a un sitio o célula específica.

Otros constructos de fusión incluyen polipéptidos heterólogos con propiedades deseadas, por ejemplo, también se contempla una región constante Ig para prolongar la vida media del suero o un anticuerpo o fragmento del mismo para direccionado. Otros sistemas de fusión producen híbridos de polipéptido donde es deseable extirpar el compañero de fusión

del polipéptido deseado. En una modalidad, el compañero de fusión se liga al polipéptido de agente de enlace específico recombinante por una secuencia de péptido que contiene una secuencia de reconocimiento específica para la proteasa. Los ejemplos de secuencias apropiadas son aquellas que se reconocen por la proteasa del virus de grabado de tabaco (Life Technologies, Gaithersburg, MD) or Factor Xa (New England Biolabs, Beverley, MA).

La invención también proporciona polipéptidos de fusión que comprenden todo o parte de un dominio variable de un anticuerpo Ang-2, tal como una región variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácido como se describe en la presente o una región variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácido como se describe en la presente en combinación con el factor de tejido truncado (tTF), un agente de direccionamiento vascular que consiste de una forma truncada de una proteína que induce la coagulación humana que actúa como un agente de coagulación del vaso sanguíneo de tumor. La fusión de tTF para el anticuerpo anti-Ang-2, o fragmentos de los mismos puede facilitar el suministro de anti-Ang-2 a células objetivo.

Variantes de Agentes de Enlace Específicos

Las variantes de agentes de enlace específicos de la presente invención incluyen variantes de inserción,

eliminación y/o sustitución. En un aspecto de la invención, se proporcionan en la presente variantes de inserción en donde uno o más residuos de aminoácido complementan una secuencia de aminoácido de agente de enlace específico. Las inserciones pueden localizarse en cualquiera o ambas terminales de la proteína, o pueden colocarse dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácido de agente de enlace específicas. Las variantes de inserción con residuos adicionales en cualquiera o ambas terminales pueden incluir, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcas o etiquetas de aminoácidos. Las variantes de inserción incluyen polipéptidos de agente de enlace específicos en donde uno o más residuos de aminoácido se agregan a una secuencia de aminoácido de agente de enlace específica, o fragmento de la misma.

Los productos de variante de la invención también incluyen productos de agente de enlace específico maduros. Tales productos de agente de enlace específicos tienen las secuencias líder o de señal removidas, sin embargo, la proteína resultante tiene residuos de terminal amino adicionales en comparación con el polipéptido Ang-2 de tipo natural. Los residuos de terminal amino adicionales pueden derivarse de otra proteína, o pueden incluir uno o más residuos que no son identificables como que se derivan de la proteína específica. Los productos de agente de enlace específicos con un residuo de metionina adicional en

la posición -1 (agente de enlace específico Met^{-1}) se contemplan, como son los productos de agente de enlace específicos con residuos de metionina y lisina adicionales en las posiciones -2 y -1 (agente de enlace específico de Met-2-Lys-1). Las variantes de agentes de enlace específicos tienen residuos Met, Met-Lys, Lys adicionales (o uno o más residuos básicos en general) son particularmente útil para aumentar la producción de proteína recombinante en células hospederas bacterianas.

La invención también abarca variantes de agente de enlace específicas que tienen residuos de aminoácido adicionales que se presentan del uso de sistemas de expresión específicos. Por ejemplo, el uso de vectores comercialmente disponibles que expresan el polipéptido deseado como parte del producto de fusión de glutation-S-transferasa (GST) proporciona el polipéptido deseado que tiene un residuo de glicina adicional en la posición de aminoácido -1 después del desdoblamiento del componente GST del polipéptido deseado. Las variantes que resultan de la expresión en otros sistemas de vector también se contemplan, incluyendo aquellas en donde las etiquetas de poli-histidina se incorporan en la secuencia de aminoácido, generalmente en las terminales carboxi y/o amino de la secuencia.

Las variantes de inserción también incluyen proteínas de fusión como se describe arriba, en donde las terminales amino

y/o carboxi de agente-polipéptido de enlace específico se fusiona a otro polipéptido, un fragmento del mismo, o secuencias de aminoácido que no se reconocen generalmente para ser parte de cualquier secuencia de proteína específica.

En otro aspecto, la invención proporciona variantes de eliminación en donde uno o más residuos de aminoácido en un polipéptido de agente de enlace específico se remueven. Las eliminaciones pueden afectar en una o ambas terminales del polipéptido de agente de enlace específico, o de la remoción de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácido de agente de enlace específico. Las variantes de eliminación incluyen necesariamente todos los fragmentos de un polipéptido de agente de enlace específico.

Los fragmentos de anticuerpo incluyen aquellas porciones del anticuerpo que se enlazan a un epítopo en el polipéptido de antígeno. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen fragmentos Fab y F(ab´)2 generados, por ejemplo, por desdoblamiento enzimático o químico de anticuerpos de longitud completa. Otros fragmentos enlazados incluyen aquellos generados por técnicas de ADN recombinante, tales como la expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de anticuerpo. La invención también abarca fragmentos de polipéptido de un agente de enlace Ang-2 en donde los fragmentos mantienen la capacidad para enlazar

específicamente un polipéptido Ang-2. Los fragmentos comprenden al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 o más aminoácidos consecutivos de un péptido o polipéptido de la invención están comprendidos entre estos. Los fragmentos de polipéptido preferidos exhiben propiedades inmunológicas únicas para o específicas para el agente enlazado al antígeno de la invención. Los fragmentos de la invención tienen las propiedades inmunológicas deseadas pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos y practicados rutinariamente en la técnica.

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona variantes de sustitución de los agentes de enlace específicos de la invención. Las variantes de sustitución se consideran generalmente que son "similares" al polipéptido original o que tienen un cierto "porcentaje de identidad" al polipéptido original, e incluyen aquellos polipéptidos en donde uno o más residuos de aminoácido del polipéptido se remueven y reemplazan con residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son conservadoras en naturaleza, sin embargo, la invención abarca sustituciones que también son no conservadoras.

La identidad y similitud de los polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente por métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York (1988);

Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); y Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Los métodos preferidos para determinar la similitud o porcentaje de identidad de dos polipéptidos se diseñan para dar la alineación más grande entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas de computadora públicamente disponibles. Los métodos de programa de computadora preferidos para determinar la identidad entre las dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el programa GCG, incluyendo GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., supra (1990)). El algoritmo Smith Waterman bien conocido también puede usarse para determinar la identidad.

Ciertos esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácido puede resultar en la alineación de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta región de alineación pequeña puede tener una identidad de secuencia muy alta aunque no hay una relación importante entre las dos secuencias de longitud completa. En consecuencia, en ciertas modalidades, el método de alineación seleccionado (programa GAP) resultará en una alineación que abarca al menos diez por ciento de la longitud completa del polipéptido objetivo comparado, esto es, al menos 40 aminoácidos contiguos donde secuencias de al menos 400 aminoácidos se comparan, 30 aminoácidos contiguos donde secuencias de al menos 300 hasta alrededor de 400 aminoácidos se comparan, al menos 20 aminoácidos contiguos donde secuencias de 200 hasta alrededor de 300 aminoácidos se comparan, y al menos 10 aminoácidos contiguos donde secuencias de alrededor de 100 hasta 200 aminoácidos se comparan.

Por ejemplo, al usar el algoritmo de computadora GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos para los cuales el porcentaje de identidad de secuencia a determinarse se alinean para apareamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos (la "extensión apareada", como se determina por el algoritmo). En ciertas modalidades, una penalización por abertura de especio (que se calcula típicamente como 3X la diagonal promedio; la

"diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación a usarse; la "diagonal" es el registro o número asignado a cada apareamiento de aminoácido por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de espacio (que es usualmente 1/10 veces la penalización de abertura de espacio), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se usan en conjunto con el algoritmo. En ciertas modalidades, una matriz de comparación estándar (ver Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3)(1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62) también se usa por el algoritmo.

En ciertas modalidades, los parámetros para la comparación de secuencia de polipéptido incluyen lo siguiente:

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

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff et al., supra (1992);

Penalización de Espacio: 12

Penalización de Longitud de Espacio: 4

Umbral de Similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En ciertas modalidades, los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros predeterminados

para comparaciones de polipéptido (junto con sin penalización para espacios finales) usando el algoritmo GAP.

En ciertas modalidades, los parámetros para comparaciones de secuencia de molécula de polinucleótido incluyen lo siguiente:

Algoritmo: Needleman et al., supra (1970);

Matriz de comparación: coincidencias = +10, no coincidencias = 0

Penalización de Espacio: 50

Penalización de Longitud de Espacio: 3

El programa GAP también puede ser útil con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros predeterminados para comparaciones de molécula de polinucleótido.

Otros algoritmos ejemplares, penalizaciones de abertura de espacio, penalizaciones de extensión de espacio, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc. pueden usarse, incluyendo aquellas establecidas en el Program Manual, Wisconsin Package, Versión 9, Septiembre 1997. Las elecciones particulares a hacerse serán aparentes para aquellos de experiencia en la técnica y dependerán de la comparación específica a hacerse, tal como ADN a ADN, proteína a proteína, proteína a ADN; y adicionalmente, si la comparación es entre los pares dados de secuencias (en cuyo caso GAP o BestFit se prefieren generalmente) o entre una secuencia y

una base de datos grande de secuencias (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).

Como se usa en la presente, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver Immunology--A Synthesis (2da Edición, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que se incorpora en la presente para referencia para cualquier propósito.

Los aminoácidos pueden tener estereoquímica ya sea L o D (excepto para Gly, que ni es L ni D) y los polipéptidos y composiciones de la presente invención pueden comprender una combinación de estereoquímicas. Sin embargo, la estereoquímica L se prefiere. La invención también proporciona moléculas inversas en donde la secuencia amino terminal a carboxi terminal de los aminoácidos es inversa. Por ejemplo, lo inverso de una molécula que tiene la secuencia normal X1-X2-X3 sería X3-X2-X1. La invención también proporciona moléculas retro-inversas en donde, como arriba, la secuencia amino terminal a carboxi terminal de aminoácidos es inversa y los residuos que son normalmente enantiómeros "L" se alteran a la forma de estereoisómero "D".

Los estereoisómeros (por ejemplo, aminoácidos D) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α-,α-disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales

también pueden ser componentes apropiados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen, sin limitación: ácido aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido aminobutírico, ácido piperidínico, ácido aminocaprioico, ácido aminoheptanoico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilaspargina, hiroxilisina, alo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, oritina, 4-hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, ε-N,N,N-trimetillisina, ε-N-acetillisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ-N-metilarginina, y otros aminoácidos similares y aminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina).

Similarmente, a menos que se especifique de otra manera, el extremo del lado izquierdo de las secuencias de polinucleótido de hebra sencilla es el extremo 5'; la dirección del lado izquierdo de secuencias de polinucleótido de hebra doble se refiere como la dirección 5'. La dirección de la adición 5' a 3' de transcriptos de ARN nacientes se refiere como la dirección de transcripción; regiones de secuencias en la hebra de ADN tienen la misma secuencia como

90

el ARN y que son 5' al extremo 5' del transcripto de ARN se refieren como "secuencias cadena arriba"; las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia como el ARN y que son 3' al extremo 3' del transcripto de ARN se refieren como "secuencias cadena abajo".

Las sustituciones de aminoácido conservadoras pueden abarcar residuos de aminoácido que no se presentan naturalmente, que se incorporan típicamente por síntesis de péptido química en vez de por síntesis en sistemas biológicos. Esto incluye peptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de porciones de aminoácidos.

Los residuos que se presentan naturalmente pueden dividirse en clases con base en las propiedades de cadena lateral:

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

2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) ácido: Asp, Glu;

4) basico: His, Lys, Arg;

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

6) aromática: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden involucrar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos

sustituidos pueden introducirse en las regiones del anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Para hacer tales cambios, de acuerdo a ciertas modalidades, puede considerarse el índice hidropático de aminoácidos. Cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático con base en sus características de hidrofobicidad y carga. Estas son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptofan (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5).

Se entiende en la técnica la importancia del índice hidropático para conferir una función biológica interactiva en la proteína. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Se conoce que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o registro hidropático similar y todavía mantienen una actividad biológica similar. Al hacer cambios con base en el índice hidropático, en ciertas modalidades, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ±2. En ciertas modalidades, se incluyen aquellos que están dentro de ±1, y en ciertas modalidades, se incluyen aquellos que están dentro de ±0.5.

Se entiende también en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse efectivamente con base en la hidrofilicidad, particularmente donde la proteína p péptido biológicamente funcional creado por ello se pretende para uso en modalidades inmunológicas, como en el caso actual. En ciertas modalidades, la hidrofilicidad promedio local más grande de la proteína, gobernada por la hidrofilicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con la propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofilicidad se han asignado a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 ± 1); glutamato (+3.0 ± 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5 ± 1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5) y triptofano (-3.4). Al hacer cambios con base a los valores de hidrofilicidad similares, en ciertas modalidades, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilicidad están dentro de ±2, en ciertas modalidades, se incluyen aquellos que están dentro de ±1, y en ciertas modalidades, se incluyen aquellos dentro de ±0.5. También se puede identificar epítopos de secuencias de aminoácido primarias con base en la

hidrofilidad. Estas regiones también se refieren como "regiones de núcleo eptitópico".

Las sustituciones de aminoácidos ejemplares se establecen en la Tabla 1.

Tabla 1

Sustituciones de Aminoácidos

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

Un técnico experto será capaz de determinar variantes apropiadas del polipéptido como se establece en la presente usando técnicas bien conocidas. En ciertas modalidades, alguien experto en la técnica pueden identificar áreas apropiadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad por regiones direccionadas no consideradas para ser importante para actividad. En ciertas modalidades, se puede identificar residuos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En ciertas modalidades, aún áreas que pueden ser importantes para actividad biológica o para estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservadoras sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente la estructura de polipéptido.

Adicionalmente, alguien experto en la técnica puede revisar los estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para actividad o estructura. En vista de tal comparación, puede predecirse la importancia de residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a los residuos de aminoácidos que son importantes para actividad o estructura en proteínas similares. Alguien experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales residuos de aminoácidos importantes predichos.

Alguien experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y secuencia de aminoácido en relación a tal estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, alguien experto en la técnica puede predecir la alineación de residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a la estructura tridimensional. En ciertas modalidades, alguien experto en la técnica puede elegir no hacer cambios radicales a los residuos de aminoácidos predichos para estar en la superficie de la proteína, ya que tales residuos pueden estar involucrados en interacciones importantes con otras moléculas. Por otro lado, alguien experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una sustitución de aminoácido sencilla en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes pueden entonces seleccionarse usando ensayos de actividad conocidos por aquellos expertos en la técnica. Tales variantes podrían usarse para reunir información acerca de las variantes apropiadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio a un residuo de aminoácido particular resulta en actividad destruida, reducida indeseablemente, o inapropiada, pueden evitarse las variantes con tal cambio. En otras palabras, con base en la información reunida de tales experimentos de rutina, el experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos donde deberán evitarse las sustituciones

adicionales ya sea solas o en combinación con otras mutaciones.

Un número de publicaciones científicas se han consagrado a la predicción de estructura secundaria. Ver Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou et al., Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chou et al., Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); Chou et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou et al., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 y Chou et al., Biophys. J., 26:367-384 (1979). Por otro lado, los programas de computadora están actualmente disponibles para asistir con la predicción de estructura secundaria. Un método para predecir la estructura secundaria se basa en el modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia mayor al 30%, o similarmente mayor al 40% a menudo tienen topologías de estructura similares. El crecimiento reciente de las bases de datos estructurales de proteína (PDB) ha proporcionado una capacidad de predicción aumentada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de pliegues dentro de la estructura del polipéptido o proteína. Ver Holm et al., Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner et al., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)) que hay un número limitado de pliegues en un polipéptido o proteína dada y que una vez que

se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se volverá dramáticamente más exacta.

Los métodos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen "hilado" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl et al., Structure, 4(1):15-19 (1996)), "análisis de perfil" (Bowie et al., Science, 253:164-170 (1991); Gribskov et al., Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskov et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358 (1987)), y "ligadura evolucionaria" (Ver Holm, supra (1999), and Brenner, supra (1997)).

En ciertas modalidades, las variantes de anticuerpo incluyen variantes de glicosilación en donde el número y/o tipo de sitio de glicosilación se ha alterado en comparación con las secuencias de aminoácido del polipéptido precursor. En ciertas modalidades, las variantes de proteína comprenden un número más alto o más bajo de sitios de glicosilación ligados a N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación ligado a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución del residuo de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona un sitio nuevo potencial para la adición de una cadena de carbohidrato ligada a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia removerán una cadena de carbohidrato ligada a N

existente. También se proporciona una reconfiguración de cadenas de carbohidrato ligadas a N en donde uno o más sitios de glicosilación ligados a N (típicamente aquellos que se presentan naturalmente) se eliminan y uno o más sitio ligados a N nuevos se crean. Las variantes de anticuerpo preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en donde uno o más residuos de cisteína se eliminan de o se sustituyen por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácido precursora. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos deberán replegarse en una conformación biológicamente activa tal como después del aislado en cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína generalmente tienen menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y típicamente tienen un número igual para minimizar las interacciones que resultan de las cisteínas dispares.

De acuerdo a ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de enlace para formar complejos de proteína, (4) alteran afinidades de enlace, y/o (5) confieren o modifican otras propiedades funcionales en tales polipéptidos. De acuerdo a ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido sencillas o múltiples (en ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido

conservadoras) pueden hacerse en la secuencia que se presenta naturalmente (en ciertas modalidades, en la porción del polipéptido fuera de los dominios que forman los contactos intermoleculares). En ciertas modalidades, una sustitución de aminoácido conservadora típicamente puede no cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia precursora (por ejemplo, un aminoácido reemplazado no deberá tender a romper una hélice que se presenta en la secuencia precursora, o romper otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia precursora). Los ejemplos de estructuras secundaria y terciaria de polipéptido reconocida en el arte se describen en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et at. Nature 354:105 (1991).

Las moléculas de agente de enlace específicas de esta invención que son variantes de sustitución de polipéptido o péptido pueden tener hasta alrededor de diez hasta veinte por ciento de secuencia de aminoácido original reemplazada. Para variantes de anticuerpo, la cadena pesada puede tener 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5,

4, 3, 2, ó 1 aminoácido reemplazado, mientras que la cadena ligera puede tener 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ó 1 aminoácido reemplazado.

Derivados de Agentes de Enlace Específicos

La invención también proporciona derivados de polipéptidos de agente de enlace específicos. Los derivados incluyen polipéptidos de agente de enlace específicos que portan modificaciones diferentes a la inserción, eliminación, o sustitución de residuos de aminoácidos. Preferiblemente, las modificaciones son covalentes en naturaleza, e incluyen por ejemplo, enlaces químicos con polímeros, lípidos, otras porciones orgánicas, e inorgánicas. Los derivados de la invención pueden prepararse para incrementar la vida media circulante de un polipéptido de agente de enlace específico, o pueden diseñarse para mejorar la capacidad de direccionado para el polipéptido a células, tejidos, u órganos deseados.

La invención abarca además agentes de enlace derivados modificados covalentemente para incluir una o más uniones de polímeros solubles en agua tales como polietilen glicol, polioxietilen glicol, o polipropilen glicol como describen las Patentes E.U.A. Nos: 4,640,835, 4,496,689, 4,301,144, 4,670,417, 4,791,192 y 4,179,337. Todavía otros polímeros útiles conocidos en la técnica incluyen monometoxi-polietilen

glicol, dextrano, celulosa, u otros polímeros basados en carbohidratos, poli-(N-vinil pirrolidona)-polietilen glicol, homopolímeros de propilen glicol, un co-polímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico, así como mezclas de estos polímeros. Son particularmente preferidos los productos de agente de enlace modificados covalentemente con subunidades de polietilen glicol (PEG). Los polímeros solubles en agua pueden unirse a posiciones específicas, por ejemplo en las terminales amino de los productos de agente de enlace específicos, o unidos aleatoriamente a una o más cadenas laterales del polipéptido. El uso de PEG para mejorar la capacidad terapéutica para el agente de enlace específico, y para anticuerpos humanizados en particular, se describe en la Patente E.U.A. 6,133,426 para Gonzales et al., publicada el 17 de octubre de 2000.

Sitios Objetivo para Mutagénesis de Anticuerpos

Pueden emplearse ciertas estrategias para manipular las propiedades inherentes de un anticuerpo específico Ang-1 y/o Ang-2, tal como la afinidad del anticuerpo por este objetivo. Estas estrategias incluyen el uso de mutagénesis específica al sitio o aleatoria de la molécula de polinucleótido que codifica el anticuerpo para generar variantes de anticuerpo, seguido por una etapa de selección diseñada para recuperar

variantes de anticuerpo que exhiben el cambio deseado, por ejemplo la afinidad incrementada o reducida.

Los residuos de aminoácidos más comúnmente direccionado en estrategias mutagénicas son aquellos en los CDRs. Como se describe arriba, estas regiones contienen los residuos que interactúan actualmente con Ang-1 y/o Ang-2 y otros aminoácidos que afectan la configuración espacial de estos residuos. Sin embargo, los aminoácidos en las regiones de estructura de los dominios variables fuera de las regiones CVDR también han mostrado hacer contribuciones sustanciales para las propiedades de enlace antigénico del anticuerpo, y pueden dirigirse para manipular tales propiedades. Ver Hudson, Curr Opin Biotech, 9:395-402 (1999) y referencias en la presente.

Las colecciones más pequeñas y más efectivamente seleccionadas de las variantes de anticuerpo pueden producirse por mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria de restricción a los sitios en los CDR que corresponden a las áras propensas a "hiper-mutación" durante el proceso de maduración por afinidad somática. Ver Chowdhury and Pastan, Nature Biotech, 17: 568-572 [1999] y referencias en la presente. Los tipos de elementos de ADN conocidos para definir sitios de hiper-mutación de esta manera incluyen repeticiones directas e invertidas, ciertas secuencias de consenso, estructuras secundarias, y palíndromas. Las

secuencias de ADN de consenso incluyen la secuencia tetrabase Purina-G-Pirimidina-A/T (es decir A o G - G - C o T - A o T) y el codón de serina AGY (en donde Y puede ser un C o un T).

De esta manera, una modalidad de la presente invención incluye estrategias mutagénicas con el punto de incrementar la afinidad de un anticuerpo para este objetivo. Estas estrategias incluyen la mutagénesis de la cadena pesada y ligera variable completa, mutagénesis sólo de las regiones CDR, mutagénesis de los sitios de hipermutación de consenso dentro de las CDR, mutagénesis de las regiones de estructura, o cualquier combinación de estos enfoques ("mutagénesis" en este contexto podría ser aleatorio o dirigido al sitio). La delineación definitiva de las regiones CDR e identificación de residuos que comprende el sitio de enlace de un anticuerpo puede alcanzarse a través de resolver la estructura del anticuerpo en cuestión, y el complejo anticuerpo-ligando, a través de técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica, tal como cristalografía de rayos X. se conocen varios métodos basados en los análisis y caracterización de tales estructuras de cristal de anticuerpo por aquellos de experiencia en la técnica y pueden emplearse, aunque no de forma definitiva, para aproximar las regiones CDR. Los ejemplos de tales métodos comúnmente usados incluyen el Kabat, Chothia, AbM definiciones de contacto.

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

Por convención, las regiones CDR en la cadena pesada se refieren típicamente como H1, H2 y H3 y se numeran secuencialmente con objeto de contabilizar desde las terminales amino a las terminales carboxi. Las regiones CDR

en la cadena ligera se refieren típicamente como L1, L2 y L3 y se numeran secuencialmente con objeto de contabilizar desde las terminales amino a las terminales carboxi.

La CDR-H1 es aproximadamente 10 hasta 12 residuos en longitud e inicia típicamente 4 residuos después de un Cys de acuerdo a las definiciones Chothia y AbM o típicamente 5 residuos después de acuerdo a la definición Kabat. La H1 típicamente se sigue por una Trp, típicamente Trp-Val, pero también Trp-Ile, o Trp-Ala. La longitud de H1 es aproximadamente 10 hasta 12 residuos de acuerdo a la definición AbM mientras que la definición Chothia excluye los últimos 4 residuos.

La CDR-H2 típicamente inicia 15 residuos después del final de H1 de acuerdo a la definición Kabat y AbM. Los residuos que preceden H2 típicamente son Leu-Glu-Trp-Ile-Gly pero hay un número de variaciones. H2 es típicamente seguido por la secuencia de aminoácido Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala. De acuerdo a la definición Kabat, la longitud de la H2 es aproximadamente 16 hasta 19 residuos donde la definición AbM predice que la longitud sea típicamente 9 hasta 12 residuos.

La CDR-H3 típicamente inicia 33 residuos después del final de H2 y típicamente se precede por la secuencia de aminoácido (típicamente Cys-Ala-Arg). La H3 típicamente es

seguida por la secuencia de aminoácido-Gly. La longitud de H3 puede ser cualquiera entre 3 hasta 25 residuos.

La CDR-L1 típicamente inicia en aproximadamente el residuo 24 y típicamente seguirá un Cys. El residuo después del CDR-L1 siempre es un Trp y típicamente iniciará la secuencia Trp-Tyr-Gln, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, o Trp-Tyr-Leu. La longitud de CDR-L1 es aproximadamente 10 hasta 17 residuos. La CDR-L1 punitiva para los anticuerpos de la invención sigue este patrón exactamente con un residuo Cys seguido por 15 aminoácidos luego Trp-Tyr-Gln.

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

La CDR-L3 típicamente inicia 33 residuos después del final de L2 y típicamente sigue un Cys. L3 es típicamente seguido por la secuencia de aminoácido Phe-Gly-XXX-Gly. La longitud de L3 es aproximadamente 7 hasta 11 residuos.

Varios métodos para modificar anticuerpos se han descrito en la técnica. Por ejemplo, Patente E.U.A. 5,530,101 (para Queen et al., 25 de junio 1996) describe métodos para producir anticuerpos humanizados en donde la secuencia de la estructura de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada es 65% hasta 95% idéntica a la secuencia de la estructura de región variable de cadena

pesada de inmunoglobulina donadora. Cada cadena de inmunoglobulina humanizada comprenderá usualmente, además de las CDR, aminoácidos de la estructura de inmunoglobulina donadora que, por ejemplo, son capaces de interactuar con las CDR para afectar la afinidad de enlace, tal como uno o más aminoácidos que son inmediatamente adyacentes a una CDR en la inmunoglobulina donadora o aquellos dentro de alrededor de 3 angstroms como se predice por el modelado molecular. Las cadenas pesada y ligera pueden cada una diseñarse al usar cualquiera o todos los diversos criterios de posición. Cuando se combina en un anticuerpo intacto, las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención serán sustancialmente no inmunogénicas en humanos y mantendrán sustancialmente la misma afinidad como la inmunoglobulina donadora al antígeno, tal como una proteína u otro compuesto que contiene un epítopo. Ver también, métodos relacionados en la Patente E.U.A. 5,693,761 para Queen, et al., publicada el 2 de diciembre de 1997 ("Polynucleotides encoding improved humanized immunoglobulins"); Patente E.U.A. 5,693,762 PARA Queen, et al., publicada el 2 de diciembre de 1997 ("Humanized Immunoglobulins"); Patente E.U.A. 5,585,089 para Queen, et al. publicada el 17 de diciembre de 1996 ("Humanized Immunoglobulins").

En un ejemplo, la Patente E.U.A. 5,565,332 para Hoogenboom et al. publicada el 15 de octubre de 1996

("Production of chimeric antibodies - a combinatorial approach") describe métodos para la producción de anticuerpos, y fragmentos de anticuerpo que tienen especificidad de enlace similar como un anticuerpo precursor pero que tienen características humanas incrementadas. Los anticuerpos se obtienen por combinado de cadena, usando, por ejemplo, tecnología de despliegue de fagos, y un polipéptido que comprende el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo no humano específico para un antígeno de interés se combina con un repertorio de dominios variables de cadena (pesada o ligera) de complementariedad humana. Los apareamientos híbridos que son específicos para el antígeno de interés se identifican y las cadenas humanas de los apareamientos seleccionados se combinan con un repertorio de dominios variables de complementariedad humana (pesado o ligero). En otra modalidad, el componente de una CDR de un anticuerpo no humano se combina con un repertorio de parte componentes de CDR de anticuerpos humanos. De la colección resultante de dímeros de polipéptido de anticuerpo, se seleccionan los híbridos y usan en una segunda etapa de combinado que humaniza. Alternativamente, esta segunda etapa se elimina si el híbrido ya es de carácter humano suficiente para ser de valor terapéutico. También se describen los métodos de modificación para incrementar el carácter humano. Ver también Winter, FEBS Letts 430:92-92 (1998).

Como otro ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de América 6,054,297 para Carter et al., publicada el 25 de abril de 2000 describe un método para hacer anticuerpos humanizados al sustituir una secuencia de aminoácido CDR para la correspondiente secuencia de aminoácido CDR humana correspondiente y/o sustituir una secuencia de aminoácido FR por las correspondientes secuencias de aminoácido FR humanas.

Como otro ejemplo, la Patente E.U.A. 5,766,886 para Studnicka et al., publicada el 16 de junio de 1998 ("Modified antibody variable domains") describe métodos para identificar los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo que pueden modificarse sin disminuir la afinidad nativa del dominio de enlace al antígeno mientras se reduce su inmunogenicidad con respecto a las especies heterólogas y métodos para preparar estos dominios variables de anticuerpo modificados que son útiles para la administración a especies heterólogas. Ver también la Patente E.U.A. 5,869,619 para Studnicka publicada el 9 de febrero de 1999.

Como se discute, la modificación de un anticuerpo por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica se diseña típicamente para alcanzar afinidad de enlace incrementada por un antígeno y/o inmunogenicidad reducida del anticuerpo en el receptor. En un enfoque, pueden modificarse los anticuerpos humanizados para eliminar los sitios de glicosilación con objeto de incrementar la afinidad del anticuerpo para este

antígeno cognado [Co et al., Mol Immunol 30:1361-1367 (1993)]. Las técnicas tales como "reorganización", "hiperquimerización", y "barnizado/repavimentado" tienen anticuerpos humanizados producidos con mayor potencial terapéutico. [Vaswami et al., Annals of Allergy, Asthma, & Immunol 81:105 (1998); Roguska et al., Prot Engineer 9:895-904 (1996)]. Ver también Patente E.U.A. 6,072,035 para Hardman et al., publicada el 6 de junio de 2000, que describe métodos para reorganizar anticuerpos. Aunque estas técnicas disminuyen la inmunogenicidad del anticuerpo al reducir el número de residuos externos, no previenen las respuestas anti-idiotípica y anti-alotípica después de la administración repetida de los anticuerpos. Las alternativas a estos métodos para reducir la inmunogenicidad se describen en Gilliland et al., J Immunol 62(6): 3663-71 (1999).

En muchos casos, los anticuerpos humanizados resultan en una pérdida de capacidad de enlace del antígeno. Por lo tanto es preferible "retromutar" el anticuerpo humanizado para incluir uno o más residuos de aminoácido encontrado en el anticuerpo original (más frecuentemente roedor) en un intento por restaurar la afinidad de enlace del anticuerpo. Ver, por ejemplo, Saldanha et al., Mol Immunol 36:709-19 (1999).

Análogos/Imitadores de Proteína de Agente de Enlace Específico No de Péptido

Adicionalmente, también se contemplan los análogos de agente de enlace específicos no de péptido de péptidos que proporcionan una estructura estabilizada o disminuyen la biodegradación. Los análogos imitadores de péptido de agente de enlace específicos pueden prepararse con base en un péptido inhibidor seleccionado al reemplazar uno o más residuos por porciones no de péptido. Preferiblemente, las porciones no de péptido permiten que el péptido mantenga su confirmación natural, o estabilizan una confirmación preferida, por ejemplo, bioactiva, que mantiene la capacidad para reconocer y enlazar Ang-1 y/o Ang-2. En un aspecto, el análogo/imitador resultante exhibe una afinidad de enlace incrementada para Ang-1 y/o Ang-2. Un ejemplo de métodos para la preparación de análogos imitadores no de péptido de péptidos de agente de enlace específicos se describe en Nachman et al., Regul Pept 57:359-370 (1995). Si se desea, los péptidos de agente de enlace específicos de la invención pueden modificarse, por ejemplo, por glicosilación, amidación, carboxilación, o fosforilación, o por la creación de sales de adición ácidas, amidas, ésteres, en particular ésteres de terminal C, y derivados de N-acilo de los péptidos de la invención. Los péptidos de agente de enlace específicos también pueden modificarse para crear derivados de péptido al formar complejos covalentes o no covalentes con otras moléculas. Los complejos enlazados covalentes pueden prepararse al ligar las

porciones químicas a los grupos funcionales en las cadenas laterales de los aminoácidos que comprenden los péptidos de agente de enlace específicos, o en las terminales N o C.

En particular, se anticipa que los péptidos de agente de enlace específicos pueden conjugarse al grupo reportero, incluyendo, pero no limitado a un radioetiquetado, una etiqueta fluorescente, una enzima (por ejemplo, que cataliza una reacción colorimétrica o fluorométrica), un sustrato, una matriz sólida, o un portador (por ejemplo, biotina o avidina). La invención en consecuencia proporciona una molécula que comprende una molécula de anticuerpo, en donde la molécula preferiblemente comprende además un grupo reportero seleccionado del grupo que consiste de un radioetiquetado, etiqueta fluorescente, una enzima, un sustrato, una matriz sólida, y un portador. Tales etiquetas son bien conocidas por aquellos de experiencia en la técnica, por ejemplo, se contemplan particularmente etiquetas de biotina. El uso de tales etiquetas es bien conocido por aquellos de experiencia en la técnica y se describen en, por ejemplo, Patente E.U.A. No. 3,817,837; Patente E.U.A. No. 3,850,752; Patente E.U.A. No. 3,996,345 y Patente E.U.A. No. 4,277,437. Otras etiquetas que serán útiles incluyen pero no se limitan a etiquetas radioactivas, etiquetas fluorescentes y etiquetas quimioluminiscentes. Las Patentes E.U.A. que conciernen al

uso de tales etiquetas incluyen por ejemplo la Patente E.U.A. No. 3,817,837; Patente E.U.A. No. 3,850,752; Patente E.U.A. No. 3,939,350 y Patente E.U.A. No. 3,996,345. Cualquiera de los péptidos de la presente invención pueden comprender uno, dos, o más de cualquiera de estas etiquetas.

Métodos para Hacer Agentes de Enlace Específicos

Los agentes de enlace específicos de la presente invención que son proteínas pueden prepararse por síntesis química en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. El límite actual para la síntesis de fase sólida es de alrededor de 85-100 aminoácidos en longitud. Sin embargo, las técnicas de síntesis química pueden a menudo usarse para ligar químicamente una serie de péptidos más pequeños para generar polipéptidos de longitud completa. Están comercialmente disponibles varios sintetizadores automáticos y pueden usarse de acuerdo con protocolos conocidos. Ver, por ejemplo, Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2d. ed., Pierce Chemical Co., (1984); Tam et al., J Am Chem Soc, 105:6442, (1983); Merrifield, Science, 232:341-347, (1986); y Barany and Merrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany et al., Int. J. Peptide Protein Res., 30, 705-739 (1987); y Pat. E.U.A. No.

5,424,398), cada una incorporada en la presente para referencia.

Los métodos de síntesis de péptido de fase sólida usan un copoli(estireno-divinilbenceno) que contiene aminas 0.1-1.0 mM/g de polímero. Estos métodos para síntesis de péptido usan protección de butiloxicarbonil (t-BOC) o 9-fluorenilmetiloxi-carbonil (FMOC) de los grupos alfa-amino. Ambos métodos involucran la síntesis en etapas por ello se agrega un aminoácido sencillo en cada etapa iniciando desde la terminal C del péptido (Ver, Coligan et al., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unidad 9). Una vez que se completa la síntesis química, el péptido sintético puede desprotegerse para remover los grupos de bloqueo de aminoácido t-BOC o FMOC y desdoblar del polímero por el tratamiento con ácido a temperatura reducida (por ejemplo, HF líquido-anisol al 10% por alrededor de 0.25 hasta alrededor de 1 hora a 0°C). Después de la evaporación de los reactivos, se extraen los péptidos de agente de enlace específicos del polímero con solución de ácido acético al 1% que luego se liofiliza para proporcionar el material crudo. Esto puede purificarse normalmente por técnicas tales como filtración en gel en Sephadex G-15 usando ácido acético al 5% como un solvente. La liofilización de fracciones apropiadas de la columna proporcionará el péptido de agente de enlace específico homogéneo o derivados de péptido, que pueden

entonces caracterizarse por técnicas estándar tales como análisis de aminoácido, cromatografía de capa delgada, cromatografía líquida de alta resolución, espectroscopía de absorción ultravioleta, rotación molar, solubilidad, y cuantificación por la degradación Edman de fase sólida.

La síntesis química de anticuerpos anti-Ang-1 y/o anti-Ang-2, derivados, variantes, y fragmentos de los mismos, así como otros agentes enlazados a Ang-2 basados en proteína permite la incorporación de aminoácidos que no se presentan naturalmente en el agente.

Las técnicas de ADN recombinante son un método conveniente para preparar anticuerpos de longitud completa y otros agentes de enlace específicos proteínicos grandes de la presente invención, o fragmentos de los mismos. Una molécula de cADN que codifica el anticuerpo o fragmento pueden insertarse en un vector de expresión, que de nuevo puede insertarse en una célula hospedera para la producción del anticuerpo o fragmento. Se entiende que los cADN que codifican tales anticuerpos pueden modificarse para variar desde el cADN "original" (traducido del mARN) para proporcionar la degeneración del codón o para permitir el uso del codón de preferencia en varias células hospederas.

Generalmente, puede obtenerse la molécula de ADN que codifica un anticuerpo usando procedimientos descritos en la presente en los Ejemplos. Donde se desea obtener moléculas

Fab o CDRs que se relacionen a la molécula de anticuerpo original, puede seleccionarse una colección apropiada (colección de despliegue de fagos; colección de linfocito, etc.) usando técnicas estándar para identificar y clonar Fabs/CDRs relacionados. Las sondas usadas para tal selección pueden ser sondas Fab de longitud completa o truncadas que codifican la porción Fab del anticuerpo original, sondas contra una o más CDR de la porción Fab del anticuerpo original, u otras sondas apropiadas. Donde se usan fragmentos de ADN como sondas, las condiciones de hibridación típicas son aquellas tales como las que se establecen en Ausubel et. al. (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press [1994]). Después de la hibridización, el blot probado puede lavarse a una severidad apropiada, dependiendo de factores tales como tamaño de sonda, homología esperada de sonda al clon, el tipo de colección a seleccionarse, y el número de clones a seleccionarse. Los ejemplos de selección de alta severidad son 0.1 X SSC, y 0.1 por ciento de SDS a una temperatura entre 50-65°C.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de vector de expresión/hospedero para contener y expresar las moléculas de polinucleótido que codifican los polipéptidos de agente de enlace específicos de la invención. Estos sistemas incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos o

vectores de expresión de ADN cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistema de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de célula de planta transfectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico de tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células de animal.

Las células de mamífero que son útiles en las producciones de proteína de agente de enlace específico recombinante incluyen pero no se limitan a células VERO, células HeLa, líneas de célula de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293, así como líneas de célula de hibridoma como se describe en la presente. Las células de mamífero se prefieren para la preparación de aquellos agentes de enlace específicos tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se glicosilan típicamente y requieren un replegado apropiado para actividad. Las células de mamífero preferidas incluyen células CHO, células de hibridoma, y células mieloides.

Algunos protocolos ejemplares para la expresión recombinante de las proteínas de agente de enlace específicas se describen en la presente enseguida.

El término "vector de expresión" se refiere a un plásmido, fago, virus o vector, para expresar un polipéptido de una secuencia de ADN (ARN). Un vector de expresión puede comprender una unidad transcripcional que comprende un montaje de (1) un elemento genético o elementos que tienen un papel regulador en la expresión de gen, por ejemplo, promotores o aumentadores, (2) una estructura o secuencia que codifica el agente de enlace que se transcribe en mARN y traduce en proteína, y (3) iniciación de transcripción adecuada y secuencias de terminación. Las unidades estructurales destinadas para usarse en sistemas de expresión de levadura o eucarióticos preferiblemente incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula hospedera. Alternativamente, donde proteína de agente de enlace específico recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, esto puede incluir un residuo de metionina de terminal amino. Este residuo puede o no se puede desdoblar posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto de agente de enlace específico final.

Por ejemplo, los agentes de enlace específicos se pueden expresar recombinantemente en levadura usando un sistema de expresión comercialmente disponible, por ejemplo, el Sistema de Expresión Pichia (Invitrogen, San Diego, CA),

siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema también se basa en la secuencia pre-pro-alfa para dirigir la secreción, pero la transcripción del inserto se conduce por el promotor de oxidasa de alcohol (AOX1) sobre la inducción con metanol.

El péptido de agente de enlace específico secretado se purificó del medio de crecimiento de levadura por, por ejemplo, los métodos usados para purificar el péptido de los sobrenadantes de célula bacteriana y de mamífero.

Alternativamente, el cADN que codificas el péptido de agente de enlace específico se puede clonar en el vector de expresión pVL1393 de baculovirus (PharMingen, San Diego, CA). Este vector se puede usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PharMingen) para infectar células de Spodoptera frugiperda en medio libre de proteína sF9 y para producir proteína recombinante. La proteína de agente de enlace específico se puede purificar y concentrar del medio usando una columna de heparina-Sefarosa (Pharmacia).

Alternativamente, el péptido se puede expresar en un sistema de insecto. Los sistemas de insecto para expresión de proteína son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. En un sistema de este tipo, el virus de poliedrosis nuclear Autographa californica (AcNPV) se puede usar como un vector para expresar genes extraños en células de Spodoptera frugiperda o en Trichoplusia larvae. El péptido de agente de

enlace específico que codifica secuencia se puede clonar en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y colocado bajo control del promotor de polihedrina. La inserción exitosa del péptido de agente de enlace específico hará el gen de polihedrina inactivo y produce virus recombinante que carece de capa de proteína de capa. Los virus recombinantes se pueden usar para infectar células S. frugiperda o Trichoplusia larvae en las cuales el péptido se expresa [Smith *et al.*, *J Virol* 46: 584 (1983); Engelhard *et al.*, *Proc Nat Acad Sci (USA)* 91: 3224-7 (1994)].

En otro ejemplo, la secuencia de ADN que codifica el péptido de agente de enlace específico se puede amplificar por PCR y clonar en un vector adecuado por ejemplo, pGEX-3X (Pharmacia). El vector pGEX se diseña para producir una proteína de fusión que comprende glutationa-S-transferasa (GST), codificada por el vector, y una proteína de agente de enlace específica codificada por un fragmento de ADN insertado en el sitio de clonación del vector. Los cebadores para el PCR se pueden generar para incluir por ejemplo, un sitio de desdoblamiento adecuado. Donde la porción de fusión de agente de enlace específico se usa únicamente para facilitar la expresión o de otra manera no es deseable como un enlace de péptido de interés, la proteína de fusión de agente de enlace específico recombinante se puede luego desdoblar de la porción GST de la proteína de fusión. El

constructo de péptido de agente de enlace específico/pGEX-3X se transforma en células E. coli XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla CA), y transformantes individuales aislados y cultivados. El ADN de plásmido de transformantes individuales se puede purificar y parcialmente procesar por secuencia usando un secuenciador automático para confirmar la presencia del agente de enlace específico deseado que codifica ácido nucleico insertado en la orientación correcta.

La expresión de polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-Ang-1 y/o anti-Ang-2 y fragmentos del mismo usando los sistemas recombinantes descritos anteriormente pueden resultar en la producción de anticuerpos o fragmentos del mismo que se deben "re-plegar" (para crear correctamente diversos puentes de disulfuro) con objeto de ser biológicamente activo. Los procedimientos de replegamiento típicos para tales anticuerpos se establecen en los Ejemplos en la presente y en la siguiente sección.

Los agentes de enlace específicos hechos en células bacterianas se pueden producir como un cuerpo de inclusión insoluble en la bacteria, se puede purificar como sigue. Las células hospederas se pueden sacrificar por centrifugación; lavadas en NaCl 0.15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; y tratadas con lisozima 0.1 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El lisado se puede aclarar por sonicación, y el desecho celular se puede

peletizar por centrifugación durante 10 minutos a 12,000 X g. El peletizado que contiene agente de enlace específico se puede resuspender en Tris 50 mM, pH 8, y EDTA 10 mM, recubierto por capas sobre glicerol al 50%, y centrifugado durante 30 min. a 6000 X g. El peletizado se puede resuspender en solución salina amortiguada con fosfato estándar (PBS) libre de Mg^{++} y Ca^{++}. El agente de enlace específico se puede además purificar por fraccionamiento del peletizado resuspendido en un gel de poliacrilamida SDS desnaturalizado (Sambrook *et al., supra*). El gel se puede sumergir en KCl 0.4 M para visualizar la proteína, que se puede extirpar y electroeluir en solución amortiguadora de funcionamiento de gel que carece de SDS. Si la proteína de fusión GST se produce en bacteria, como una proteína soluble, se puede purificar usando el Módulo de Purificación GST (Pharmacia).

Los sistemas hospederos de mamífero para la expresión de la proteína recombinante son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Las cepas de célula hospedera se pueden elegir por una capacidad particular para procesar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones posteriores a la traducción que serán útiles en proporcionar actividad de proteína. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Las

diferentes células hospederas tal como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, así como líneas de célula de hibridoma, y similares tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades posterior a la traducción y se pueden elegir para asegurar la modificación correcta y procesamiento de la proteína exterior, introducida.

Un número de sistemas de selección se pueden usar para recuperar las células que se han transformado para producción de proteína recombinante. Tales sistemas de selección incluyen, pero no se limitan a, genes de timidina cinasa HSV, fosforibosiltransferasa de hipoxantina-guanina y fosforibosiltransferasa adenina, en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También, resistencia de anti-metabolito se puede usar como la base de selección para DHFR que confiere resistencia a metotrexato; gpt que confiere resistencia a ácido micofenólico; neo que confiere resistencia al aminoglucósido G418 y confiere resistencia a clorsulfuron; e higro que confiere resistencia a higromicina. Los genes seleccionables adicionales que pueden ser útiles incluyen trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina. Los marcadores que dan una indicación visual para la identificación de

transformantes incluyen antocianinas, β-glucuronidasa y su sustrato, GUS, y luciferasa y su sustrato, luciferina.

Purificación y Replegamiento de Agentes de Enlace Específicos

En algunos casos, los agentes de enlace específicos producidos usando procedimientos descritos anteriormente pueden necesitar que se "replieguen" y oxidar en una estructura terciaria adecuada y generando ligaduras de disulfuro con objeto de ser biológicamente activo. El replegamiento se puede realizar usando un número de procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, exponer el agente de polipéptido solubilizado a un pH usualmente arriba de 7 en la presencia de un agente caotrópico. La selección de caotropo es similar a las opciones usadas para inclusión de solubilización de cuerpo, sin embargo un caotropo se usa típicamente en una concentración inferior. Un agente caotrópico ejemplar es guanidina. En la mayoría de los casos, la solución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente de reducción más su forma oxidada en una relación específica para generar un redox potencial particular que permite el mezclado de dusykfide que ocurre para la formación de puentes de cisteína. Algunos pares redox comúnmente usados incluyen cisteína/cistamina, glutationa/ditiobisGSH, cloruro de cobre, ditiotreitol DTT/ditiano DTT, y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-

bME. En muchas instancias, un co-solvente se puede usar para incrementar la eficiencia del replegamiento. Los Co-solventes comúnmente usados incluyen glicerol, polietilen glicol de diversos pesos moleculares, y arginina.

Será deseable purificar proteínas de agente de enlace específico o variantes de los mismos de la presente invención. Las técnicas de purificación de proteína son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento crudo de las fracciones de polipéptido y sin polipéptido. Que tienen separado el polipéptido de agente de enlace específico de otras proteínas, el polipéptido de interés se puede además purificar usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para alcanzar purificación parcial o completa (o purificación a homogeneidad). Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido de agente de enlace específico puro son cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de exclusión; electroforesis de gel de poliacrilamida; enfoque isoeléctrico. Un método particularmente eficiente para purificar péptidos es cromatografía líquida de proteína rápida o aún HPLC.

Ciertos aspectos de la presente invención se refieren a la purificación, y en particular modalidades, la purificación sustancial, de un péptido o proteína de agente de enlace específico codificado. El término "péptido o proteína de

agente de enlace específico codificado" como se usa en la presente, se pretende referirse a una composición, aislable de otros componentes, en donde el péptido o proteína de agente de enlace específico se purificó a cualquier grado relativo a su estado naturalmente obtenible. Un péptido o proteína de agente de enlace específico codificado por lo tanto también se refiere a un péptido o proteína de agente de enlace específico, libre del ambiente en el cual se puede presentar naturalmente.

Generalmente, "purificado" se referirá a una composición de agente de enlace específico que se ha sometido a fraccionamiento para remover diversos de otros componentes, y cuya composición sustancialmente conserva su actividad biológica expresada. Donde el término "sustancialmente purificado" se usa, esta designación se referirá a una composición de agente de enlace específico en el cual el péptido o proteína de agente de enlace específico forma el componente principal de la composición, tal como constituir alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 95% o más de la proteínas en la composición.

Diversos de los métodos para cuantificar el grado de purificación del agente de enlace específico se conocerán por aquellos expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la

actividad de enlace específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de polipéptidos de agente de enlace específico dentro de una fracción por análisis SDS/PAGE. Un método preferido para evaluar la pureza de una fracción de agente de enlace específico es calcular la actividad de enlace de la fracción, para comparar esto con la actividad de enlace del extracto inicial, y para así calcular el grado de purificación, en la presente evaluado por un "número de purificación de pliegue." Las unidades actuales usadas para representar la cantidad de actividad de enlace serán, por supuesto, dependientes de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación y si o no el péptido o proteína de agente de enlace específico expresada exhibe una actividad de enlace detectable.

Diversas técnicas adecuadas para usar en purificación de proteínas de agente de enlace específico serán conocidas por aquellos expertos en la técnica. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos (inmunoprecipitación) y similares o por desnaturalización de calor, seguido por centrifugación; etapas de cromatografía tal como cromatografía de afinidad (por ejemplo, Proteína-A-Sefarosa), intercambio de ion, filtración de gel, fase inversa, hidroxilapatita y cromatografía de afinidad; enfoque isoeléctrico; electroforesis de gel; y combinaciones de tales y otras

técnicas. Como se conoce generalmente en la técnica, se cree que la orden de conducir las diversas etapas de purificación se puede cambiar, o que ciertas etapas se pueden omitir, y todavía resulta en un método adecuado para la preparación de un agente de enlace específico sustancialmente purificado.

No hay requisito general de que el agente de enlace específico siempre sea proporcionado en su estado más purificado. En efecto, se contempla que menos productos de agente de enlace sustancialmente específico tendrá utilidad en ciertas modalidades. La purificación parcial se puede lograr al usar pocas etapas de purificación en combinación, o al utilizar diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía de columna de intercambio de catión realizada utilizando un aparato HPLC generalmente resultará en una purificación de "-pliegue" mayor que la misma técnica que utiliza un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que exhiben un grado menor de purificación relativa pueden tener ventajas en recuperación total de producto de proteína de agente de enlace específico, o en mantener actividad de enlace de una proteína de agente de enlace específico expresado.

Se conoce que la migración de un polipéptido puede variar, algunas veces significativamente, con diferentes condiciones de SDS/PAGE [Capaldi *et al.*, *Biochem Biophys* \

Res Comm, 76: 425 (1977)]. Por lo tanto se apreciará que bajo diferentes condiciones de electroforesis, los pesos moleculares aparentes de productos de expresión de agente de enlace específico purificado o parcialmente purificado pueden variar.

Ensayos de Enlace

Los ensayos de enlace inmunológicos típicamente utilizan un agente de captura para enlazar específicamente a y frecuentemente inmovilizar el antígeno objetivo de analito. El agente de captura es una porción que específicamente enlaza al analito. En una modalidad de la presente invención, el agente de captura es un anticuerpo o fragmento del mismo que específicamente enlaza Ang-2 y / o Ang-1. Estos ensayos de enlace inmunológicos son bien conocidos en la técnica [ver, Asai, ed., Methods in Cell Biology, Vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., New York (1993)].

Los ensayos de enlace inmunológicos frecuentemente utilizan un agente de etiquetado que señalará la existencia del complejo enlazado formado por el agente de captura y antígeno. El agente de etiquetado puede ser una de las moléculas que comprende el complejo enlazado; esto es, esto puede ser agente de enlace específico etiquetado o un anticuerpo de agente de enlace anti-específico etiquetado.

Alternativamente, el agente de etiquetado puede ser una tercera molécula, comúnmente otro anticuerpo, que enlaza al complejo enlazado. El agente de etiquetado puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de agente de enlace anti-específico que porta una etiqueta. El segundo anticuerpo, específico para el complejo enlazado, puede carecer de una etiqueta, pero se puede enlazar por una cuarta molécula específica para las especies de anticuerpos que el segundo anticuerpo es un miembro de. Por ejemplo, el segundo anticuerpo se puede modificar con una porción detectable, tal como biotina, que se puede luego enlazar por una cuarta molécula, tal como estreptavidina etiquetada con enzima. Otras proteínas capaces de enlazar específicamente regiones constantes de inmunoglobulinas, tal como proteína A o proteína G se pueden también usar como el agente de etiquetado. Estas proteínas de enlace son constituyentes normales de las paredes celulares de bacteria de estreptococo y exhiben una reactividad no inmunogénica fuerte con regiones constantes de inmunoglobulinas de una variedad de especies [ver, generalmente Akerstrom, *J Immunol*, 135: 2589-2542 (1985); y Chaubert, *Mod Pathol*, 10:585-591 (1997)].

A lo largo de los ensayos, la incubación y/o etapas de lavado se pueden requerir después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar desde alrededor de 5 segundos a varias horas, preferiblemente desde

alrededor de 5 minutos hasta alrededor de 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá sobre el formato de ensayo, analito, volumen de solución, concentraciones, y similares. Usualmente, los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque puede llevarse a cabo sobre un rango de temperaturas.

A. Ensayos de enlace no competitivos:

Los ensayos de enlace inmunológicos pueden ser del tipo no competitivo. Estos ensayos tienen una cantidad de analito capturado que se mide directamente. Por ejemplo, en un ensayo de "intercalado" preferido, el agente de captura (anticuerpo) se puede encontrar directamente a un sustrato sólido donde esto se inmobiliza. Estos anticuerpos inmovilizados luego capturan (enlazado a) antígeno presente en la misma prueba. La proteína así inmovilizada se enlaza luego a un agente de etiquetado, tal como un segundo anticuerpo que tiene una etiqueta. En otro ensayo de "intercalado" preferido, el segundo anticuerpo carece de una etiqueta, pero se puede enlazar por un anticuerpo etiquetado específico para anticuerpos de la especie de la cual el segundo anticuerpo se deriva. El segundo anticuerpo también se puede modificar con una porción detectable, tal como biotina, a la que una tercera molécula etiquetada puede específicamente enlazar, tal como estreptavidina. [Ver, Harlow and Lane, Antibodies, A

Laboratory Manual, Ch 14, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988), incorporada en la presente como referencia].

B. Ensayos de Enlace Competitivos:

Los ensayos de enlace inmunológicos pueden ser del tipo competitivo. La cantidad de analito presente en la muestra se mide indirectamente al medir la cantidad de un analito agregado desplazado, o competido fuera, de un agente de captura por el analito presente en la muestra. En un ensayo de enlace competitivo preferido, una cantidad conocida de analito, usualmente etiquetada, se agrega a la muestra y la muestra se contacta luego con un anticuerpo (el agente de captura). La cantidad de analizar etiquetado enlazada al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra. (Ver, Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, pp. 579-583, *supra*).

En otro ensayo de enlace competitivo preferido, el anticuerpo se inmoviliza en un sustrato sólido. La cantidad de proteína enlazada al anticuerpo se puede determinar ya sea al medir la cantidad de proteína presente en un complejo de proteína/anticuerpo, o alternativamente al medir la cantidad de proteína no compleja restante. La cantidad de proteína se puede detectar al proporcionar una proteína etiquetada. Ver, Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, *supra*).

Aún en otro ensayo de enlace competitivo preferido, se utiliza inhibición de hapteno. Aquí, un analito conocido se inmoviliza en un sustrato sólido. Una cantidad conocida de anticuerpo se agrega a la muestra, y la muestra se contacta con el analito inmovilizado. La cantidad de anticuerpo enlazado al analito inmovilizado es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. La cantidad de anticuerpo inmovilizado se puede detectar al detectar ya sea la fracción inmovilizada de anticuerpo o la fracción que permanece en solución. La detección puede ser directa cuando el anticuerpo se etiqueta o indirecta por la adición posterior de una porción etiquetada que específicamente se enlaza al anticuerpo como se describe arriba.

C. Utilización de Ensayos de Enlace Competitivos:

Los ensayos de enlace competitivos se pueden usar para determinaciones de reactividad cruzada para permitir a un experto en la técnica determinar si una proteína o complejo de enzima que se reconoce por un agente de enlace específico de la invención es la proteína deseada y no una molécula de reacción cruzada o para determinar si el anticuerpo es específico para el antígeno y no enlaza antígenos no relacionados. En los ensayos de este tipo, el antígeno se puede inmovilizar a un soporte sólido y una mezcla de proteína desconocida se agrega al ensayo, lo que competirá

con el enlace de los agentes de enlace específicos a la proteína inmovilizada. La molécula de competencia también enlaza uno o más antígenos no relacionados al antígeno. La capacidad de las proteínas para competir con el enlace de los anticuerpos de los agentes de enlace específicos al antígeno inmovilizado se compara con el enlace por la misma proteína que se inmovilizó con el soporte sólido para determinar la reactividad cruzada de la mezcla de proteína.

D. Otros Ensayos de Enlace

La presente invención también proporciona métodos de manchado Western para detectar o cuantificar la presencia de Ang-1 y / o Ang-2 en una muestra. La técnica generalmente comprende separación de proteínas de muestra por electroforesis de gel en la base de peso molecular y transferencia de las proteínas a un soporte sólido adecuado, tal como filtro de nitrocelulosa, un filtro de nylon, o compuesto de partida de filtro de nylon. La muestra se incuba con anticuerpos o fragmentos del mismo que específicamente enlazan Ang-1 y / o Ang-2 y el complejo resultante se detecta. Estos anticuerpos se pueden etiquetar directamente o alternativamente se pueden detectar posteriormente usando anticuerpos etiquetados que específicamente enlazan al anticuerpo.

Los ensayos de enlace para detectar aquellos agentes de enlace específicos Ang-1 y / o Ang-2 que interrumpen enlace

Ang-2 a su receptor se establecen en los Ejemplos en la presente.

Ensayos de Diagnóstico

Los anticuerpos o fragmentos de enlace al antígeno del mismo de la presente invención son útiles para el diagnóstico de afecciones o enfermedades caracterizadas por expresión de Ang-1 y / o Ang-2 o subunidades, o en ensayos para vigilar pacientes que se tratan con inductores de Ang-1 y / o Ang-2, sus fragmentos, agonistas o inhibidores de actividad Ang-1 y / o Ang-2. Los ensayos de diagnóstico para Ang-1 y / o Ang-2 incluyen métodos que utilizan un agente de enlace específico y una etiqueta para detectar Ang-1 y / o Ang-2 en fluidos corporales humanos o extractos de células o tejidos. Los agentes de enlace específicos de la presente invención se pueden usar con o sin modificación. En un ensayo de diagnóstico preferido, los agentes de enlace específicos se etiquetarán al enlazar, por ejemplo, una etiqueta o una molécula reportero. Una amplia variedad de etiquetas y moléculas de reportero se conocen, algunas de las cuales ya se han descrito en la presente. En particular, la presente invención es útil para el diagnóstico de enfermedad humana.

Una variedad de protocolos para medir proteínas Ang-1 y / o Ang-2 usando ya sea anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteína respectiva se

conocen en la técnica. Los ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Un inmunoensayo basado en monoclonal, dos sitios que utiliza anticuerpos reactivos monoclonales para dos epítopos sin interferencia en Ang-1 y / o Ang-2 se prefiere, pero un ensayo de enlace competitivo se puede emplear. Estos ensayos se describen, por ejemplo, en Maddox *et al., J Exp Med*, 158:1211 [1983].

Con objeto de proporcionar una base para diagnóstico, valores normales o estándar para expresión de Ang-1 y / o Ang-2 humana se establecen usualmente. Esta determinación se puede realizar al combinar fluidos corporales o extractos celulares de sujetos normales, preferiblemente humano, con un agente de enlace específico, por ejemplo, un anticuerpo, a Ang-1 y / o Ang-2, bajo condiciones adecuadas para formación de complejo que son bien conocidos en la técnica. La cantidad de formulación de complejo estándar se puede cuantificar al comparar el enlace de los agentes de enlace específicos con cantidades conocidas de proteína Ang-1 y / o Ang-2, con tanto control como muestras de enfermedad. Entonces, los valores estándar obtenidos de muestras normales se pueden comparar con valores obtenidos de las muestras de sujetos potencialmente afectados por la enfermedad. Las desviación

estándar entre valores estándar o sujetos sugieren un papel para Ang-1 y / o Ang-2 en el estado de la enfermedad.

Para aplicaciones de diagnóstico, en ciertas modalidades, los agentes de enlace específicos típicamente se etiquetarán con una porción detectable. La porción detectable puede ser cualquiera que es capaz de producir, ya sea directamente o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la porción detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, o ^{125}I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceina, rodamina, o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o peroxidasa de raíz de rábano [Bayer *et al.*, *Meth Enz*, 184: 138-163, (1990)].

Enfermedades

La presente invención proporciona un agente de enlace específico que se enlaza a Ang-1 y/o Ang-2 que es útil para el tratamiento de enfermedades humanas y condiciones patológicas. Los agentes que modulan la actividad de enlace Ang-1 y/o Ang-2, u otra actividad celular, se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos para mejorar sus efectos terapéuticos o disminuir sus efectos secundarios potenciales.

En un aspecto, la presente invención proporciona reactivos y métodos útiles para tratar enfermedades y condiciones

caracterizadas por niveles indeseables o aberrantes de la actividad Ang-1 y/o Ang-2 en una célula. Estas enfermedades incluyen cánceres, y otras condiciones hiperproliferativas, tal como hiperplasia, psoriasis, dermatitis de contacto, desórdenes inmunológicos e infertilidad.

La presente invención también proporciona métodos para tratar cáncer en un animal, incluyendo humanos, que comprende administrar al animal una cantidad efectiva de un agente de enlace específico que inhibe o disminuye la actividad Ang-1 y/o Ang-2. La invención se dirige además a métodos para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que incluyen procesos de proliferación celular, invasión, y metástasis en sistemas biológicos. Los métodos incluyen el uso de un compuesto de la invención como un inhibidor del crecimiento de células cancerosas. Preferiblemente, los métodos se emplean para inhibir o reducir el crecimiento de células cancerosas, invasión, metástasis o incidencia de tumores en animales vivientes tales como mamíferos. Los métodos de la invención también son fácilmente adaptables para el uso en sistemas de ensayo, *por ejemplo*, someter a ensayo el crecimiento de células cancerosas y propiedades del mismo, así como también identificar los compuestos que afectan el crecimiento de células cancerosas.

Los cánceres tratables por métodos de la presente invención ocurren preferiblemente en mamíferos. Los mamíferos

incluyen, por ejemplo, humanos y otros primates, así como también mascotas o animales de compañía tales como perros y gatos, animales de laboratorio tales como ratas, ratones y conejos, y animales de granja tales como caballos, cerdos, ovejas y ganado vacuno.

Los tumores o neoplasmas incluyen crecimientos de células de tejido en las cuales la multiplicación de las células es incontrolada y progresiva. Algunos de estos crecimientos son benignos, pero otros son llamados malignos y pueden conducir a la muerte del organismo. Los neoplasmas o cánceres malignos se distinguen de los crecimientos benignos en que, además de exhibir proliferación celular agresiva, pueden invadir los tejidos circundantes y convertirlos en metástasis. Por otra parte, los neoplasmas malignos son caracterizados en que muestran una mayor pérdida de diferenciación (mayor desdiferenciación), y de su organización relativa entre sí y sus tejidos circundantes. Esta propiedad también es llamada "anaplasia".

Los neoplasmas tratables por la presente invención también incluyen tumores sólidos, *es decir*, carcinomas y sarcomas. Los carcinomas incluyen aquellos neoplasmas malignos derivados de células epiteliales que infiltran (invaden) los tejidos circundantes y dan origen a la metástasis. Los adenocarcinomas son carcinomas derivados de tejido glandular, o los cuales forman estructuras glandulares

reconocibles. Otra categoría amplia o cánceres incluyen sarcomas, los cuales son tumores cuyas células se incrustan en una sustancia fibrilar u homogénea similar al tejido conjuntivo embriónico. La invención también permite el tratamiento de cánceres de los sistemas mieloides o linfoides, que incluyen leucemias, linfomas y otros cánceres que no se presentan típicamente como una masa tumoral, sino se distribuyen en los sistemas vasculares o linforeticulares.

El tipo de cáncer o células tumorales susceptibles al tratamiento de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, tumor productor de ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de la corteza adrenal, cáncer de la vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cáncer colorectal, linfoma cutáneo de células T, cáncer endometrial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (célula pequeña y no pequeña), efusión peritoneal maligna, efusión pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, glioma, linfoma no de Hodgkin, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de ovario (célula germinal), cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de próstata, retinoblastoma, cáncer de piel, sarcoma de

tejido blando, carcinomas de células escamosas de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, neoplasmas trofoblásticos, cáncer uterino, cáncer vaginal, cáncer de la vulva y tumor de Wilm.

La invención se ilustra particularmente en este documento en referencia al tratamiento de ciertos tipos de cánceres experimentalmente definidos. En estos tratamientos ilustrativos, se han usado modelos *in vitro* e *in vivo* de última generación estándar. Estos métodos se pueden usar para identificar agentes que se pueden esperar que sean eficaces en los regímenes de tratamiento in vivo. Sin embargo, se entenderá que el método de la invención no se limita al tratamiento de estos tipos de tumores, sino se extiende a cualquier tumor sólido derivado de cualquier sistema orgánico. Los cánceres cuya invasión o metástasis que se asocian con la expresión o actividad Ang-2 son especialmente susceptibles a ser inhibidos o aún inducidos a la regresión por medio de la invención.

La invención también se puede practicar al incluir con un agente de enlace específico de la invención, tal como un anticuerpo, en combinación con otro agente quimioterapéutico anticáncer, tal como cualquiera agente quimioterapéutico convencional. La combinación de un agente de enlace específico con estos otros agentes puede potenciar el protocolo quimioterapéutico. Los numerosos protocolos

quimioterapéuticos se presentarán en la mente del practicante experto por ser capaz de la incorporación en el método de la invención. Cualquier agente quimioterapéutico se puede usar, incluyendo agentes alquilantes, antimetabolitos, hormonas y antagonistas, radioisótopos, así como también productos naturales. Por ejemplo, el compuesto de la invención se puede administrar con antibióticos tal como doxorubicina y otros análogos de antraciclina, mostazas de nitrógeno tal como ciclofosfamida, análogos de pirimidina tal como 5-fluorouracilo, cisplatino, hidroxiurea, taxol y sus derivados naturales sintéticos, y los similares. Como otro ejemplo, en el caso de tumores mezclados, tal como adenocarcinoma del seno, donde los tumores incluyen células dependientes de gonadotropina e independientes de gonadotropina, el compuesto se puede administrar en conjunción con leuprolide o goserelina (análogos de péptido sintético de LH-RH). Otros protocolos antineoplásicos incluyen el uso de un compuesto de tetraciclina con otra modalidad de tratamiento, *por ejemplo,* cirugía, radiación, etcétera, también referidas en este documento como "modalidades antineoplásica adjuntas". De esta manera, el método de la invención se puede emplear con estos regímenes convencionales con el beneficio de reducir los efectos secundarios y mejorar la eficacia.

La presente invención proporciona de esta manera composiciones y métodos útiles para el tratamiento de una amplia variedad de cánceres, que incluyen tumores sólidos y leucemias. Los tipos de cáncer que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a: adenocarcinoma del seno, próstata y colon; todas las formas de carcinoma broncogénico del pulmón; mieloide; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; branquioma; síndrome carcinoide maligno; enfermedad cardíaca carcinoide; carcinoma (*por ejemplo*, Walker, célula basal, basosescamoso, Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, Krebs 2, célula de merkel, mucinoso, célula pequeñas de pulmón, células de avena, papilar, duro, bronquiolar, broncogénico, células escamosas, y células transicionales); desórdenes histiocíticos; leucemia; histiocitosis maligna; enfermedad de Hodgkin; carcinoma de células pequeñas de pulmón inmunoproliferativas; linfoma no de Hodgkin; plasmacitoma; reticuloendoteliosis; melanoma; condroblastoma; condroma; condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumores de célula gigante; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; cordoma; craniofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma; miosarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; tumor tofoblástico. Además, los siguientes tipos de cánceres también se pueden tratar: adenoma; colangioma;

colesteatoma; ciclindroma; cistadenocarcinoma; cistadenoma; tumor de células granulosas; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumor de célula de islote; tumor de célula de Leydig; papiloma; tumor de célula de Sertoli; tumor de célula tecal; leiomioma; leiomiosarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rabdomioma; rabdomiosarcoma; ependimoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitelioma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma no cromafines; angioqueratoma; hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatosis; glomangioma; hemangioendotelioma; hemangioma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; linfangioma; linfangiomioma; linfangiosarcoma; pinealoma; carcinosarcoma; condrosarcoma; cistosarcoma filodes; fibrosarcoma; hemangiosarcoma; leiomiosarcoma; leucosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; miosarcoma; mixosarcoma; carcinoma de ovario; rabdomiosarcoma; sarcoma; neoplasmas; nerofibromatosis; y displasia cervical.

Otro aspecto de la presente invención es usar los materiales y métodos de la presente invención para prevenir y/o tratar cualquier condición hiperproliferativa de la piel que incluye psoriasis y dermatitis de contacto u otras enfermedades hiperproliferativas. Se ha demostrado que pacientes con psoriasis y dermatitis de contacto han elevado

la actividad Ang-2 dentro de estas lesiones [Ogoshi y colaboradores, *J. Inv. Dermatol.*, 110:818-23 (1998)]. Preferiblemente, los agentes de enlace específicos para Ang-2 se usarán en combinación con otros agentes farmacéuticos para tratar humanos que expresen estos síntomas clínicos. Los agentes de enlace específicos se pueden suministrar usando cualquiera de los diversos portadores a través de las vías de administración descritas en este documento y otras que son bien conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo.

Otros aspectos de la presente invención incluyen tratamiento de varias retinopatías (que incluyen retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad) en la cual se implica la angiogénesis, así como también desórdenes/enfermedades del tractor reproductor femenino tal como endometriosis, fibroides uterinos y otras de estas condiciones asociadas con la proliferación vascular disfuncional (que incluye crecimiento microvascular endometrial) durante el ciclo reproductor femenino.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere al tratamiento del crecimiento vascular anormal que incluye malformaciones arteriovenosas cerebrales (AVMs), lesión y reparación de la mucosa gastrointestinal, ulceración de la mucosa gastroduodenal en pacientes con una historia de

enfermedad de úlcera péptica, que incluye isquemia que resulta de apoplejía, un amplio espectro de desórdenes vasculares pulmonares en enfermedad de hígado e hipertensión por tal en pacientes con hipertensión portal en pacientes con hipertensión portal no hepática.

Otro aspecto de la presente invención es la prevención de cánceres usando las composiciones y métodos proporcionados por la presente invención. Estos reactivos incluirán agentes de enlace específicos contra Ang-2.

Composiciones Farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de los agentes de enlace específicos de Ang-1 y/o Ang-2 están dentro del alcance de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos se describen con detalle en, por ejemplo, Patente de E.U.A No. 6,171,586, de Lam *colaboradores*, expedida el 9 de Enero de 2001. Estas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un agente de enlace específico, tal como un anticuerpo, o un fragmento, variante, derivado o fusión del mismo como se describe en este documento, en una mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable. En una modalidad preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden antagonistas de agentes de enlace específicos que modulan parcial o

completamente por lo menos una actividad biológica de Ang-1 y/o Ang-2 en mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los agentes de enlace específicos se purificarán suficientemente para la administración a un animal.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tal como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno-sulfito de sodio); soluciones amortiguadoras (tal como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes de volumen (tal como manitol o glicina), agentes quelantes [al como ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA)]; agentes de complejo (tal como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenadores; monosacáridos; disacáridos y otros carbohidratos (tal como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tal como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); colorantes; agentes

saborizantes y de dilución; agentes emulsionadores; polímeros hidrofílicos (tal como polivinilpirrolidona); polipéptidos de peso molecular bajo; contraiones formadores de sal (tal como sodio); conservadores (tal como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); solventes (tal como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tal como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; surfactantes o agentes humectantes (tal como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitan, polisorbatos tal como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes mejoradores de estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes mejoradores de tonicidad (tal como haluros de metal alcalino (preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de suministro; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

La composición farmacéutica óptima se determinará por la persona experta en el campo dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración propuesta, formato de suministro y dosificación deseada. Véase por ejemplo,

Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*. Estas composiciones pueden afectar el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, y velocidad de eliminación *in vivo* del agente de enlace específico.

El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser ya sea acuoso o no acuoso en carácter. Por ejemplo, un vehículo portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, suplementado posiblemente con otros materiales comunes en las composiciones para la administración parenteral. La solución salina amortiguada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos ejemplares adicionales. Otras composiciones farmacéuticas ejemplares comprenden solución amortiguadora Tris de aproximadamente pH 7.0-8.5, o solución amortiguadora de acetato de aproximadamente pH 4.0-5.5, las cuales pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En una modalidad de la presente invención, las composiciones de agente de enlace se pueden preparar para almacenamiento al mezclar la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) en la forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, el producto de agente de enlace se puede formular como un

liofilizado que usa excipientes apropiados tal como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas se pueden seleccionar para el suministro parenteral. Alternativamente, las composiciones se pueden seleccionar para inhalación o para el suministro enteral tal como oral, auricular, oftálmica, rectal, o vaginal. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la experiencia del campo.

Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables al sitio de administración. Por ejemplo, se usan soluciones amortiguadoras para mantener la composición en pH fisiológico o a un pH ligeramente más bajo, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para el uso en esta invención pueden estar en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógeno que comprende el agente de enlace específico deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es agua destilada estéril en la cual un agente de enlace se formula como una solución isotónica, estéril, conservada apropiadamente.

(5)

Todavía otra preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporciona la liberación controladas o sostenida del producto el cual luego se puede suministrar por la vía de una inyección de depósito. También se puede usar ácido hialurónico, y este puede tener el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de suministro de fármacos implantables.

En otro aspecto, las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en soluciones amortiguadoras fisiológicamente compatibles como solución de Hanks, solución de Ringer, o solución salina fisiológicamente amortiguadas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones de inyección aceitosa apropiadas. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tal como aceite de

ajonjolí, o ésteres de ácido graso sintéticos, tal como oleato de etilo, triglicéridos, o liposomas. También se pueden usar aminopolímeros policatiónicos no lípidos para el suministro. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadoras o agentes adecuados para incrementar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

En otra modalidad, se puede formular una composición farmacéutica para inhalación. Por ejemplo, un agente de enlace se puede formular como un polvo seco para inhalación. También se pueden formular soluciones de inhalación de moléculas de polipéptido o ácido nucleico con un propelente para el suministro con aerosol. En todavía otra modalidad, las soluciones se pueden nebulizar. La administración pulmonar se describe además en la Solicitud de PCT No. PCT/US94/001875, la cual describe el suministro pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

También se contempla que ciertas formulaciones se puedan administrar oralmente. En una modalidad de la presente invención, las moléculas de agente de enlace que se administran en esta forma se pueden formular con o sin aquellos portadores usados acostumbradamente en la composición de las formas de dosificación sólidas tales como tabletas y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula se

puede diseñar para liberar la porción activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación pre-sistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula de agente de enlace. Diluyentes, saborizantes, ceras de punto de fusión bajo, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de tabletas y aglutinantes también se pueden emplear.

Composiciones farmacéuticas para la administración oral también se pueden formular usando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en el campo en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Estos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas espesas, suspensiones y los similares, para la ingestión por el paciente.

Las preparaciones farmacéuticas para el uso oral se pueden obtener a través de compuestos activos de combinación con el excipiente sólido y el procesamiento de la mezcla resultante de gránulos (opcionalmente, después de la molienda) para obtener tabletas o núcleos de grageas. Se pueden agregar auxiliares adecuados, si se desea. Los excipientes adecuados incluyen rellenos de

carbohidrato o proteínas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, papa u otras plantas; celulosa, tal como metilcelulosa, hidroxipropimetil-celulosa o carboximetilcelulosa de sodio; gomas, que incluyen arábigas y tragacanto; y proteínas tal como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes o desolubilización, tal como polivinilpirrolidona reticulada, agar y ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

Se pueden usar núcleos de grageas en conjunción con recubrimientos adecuados, tal como soluciones de azúcar concentradas, las cuales también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Se pueden agregar materias colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, dosificación.

Preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente también incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como también cápsulas selladas, blandas hechas de gelatina y un recubrimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes

activos mezclados con rellenadores aglutinantes, tal como lactosa o almidones, lubricantes, tal como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tal como aceites grasos, líquido, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad efectiva de agente aglutinante en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la manufactura de tabletas. Al disolver las tabletas en agua estéril u otro vehículo apropiado, las soluciones se pueden preparar en forma de dosificación unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tal como carbonato de calcio, carbonato de sodio o bicarbonato, lactosa, o fosfato de calcio, o agentes de enlace, tal como almidón, gelatina, o acacia; o agentes lubricantes tal como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para aquellas personas expertas en el campo, que incluyen formulaciones que implican moléculas de agente de enlace en formulaciones de suministro sostenido controlado. Las técnicas para formular una variedad de otros medios de suministro sostenido o controlado, tal

como portadores de liposoma, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidos por aquellas personas expertas en el campo. Véase por ejemplo, el documento PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de composiciones farmacéuticas. Ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímeros semipermeables en la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidos (U.S. 3,773,919, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato [Sidman *y colaboradores, Biopolymers*, 22:547-556 (1983)], poli-(2-hidroxietil-metacrilato) [Langer *y colaboradores, J Biomed Mater Res*, 15:167-277, (1981)] y [Langer *y colaboradores, Chem Tech*, 12:98-105(1982)], acetato de etilen-vinilo (Langer *y colaboradores, supra*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988). Las composiciones de liberación sostenida incluyen liposomas, los cuales se pueden preparar mediante cualquiera de varios métodos conocidos en el campo. Véase por ejemplo, Eppstein *y colaboradores, Proc Natl Acad Sci (EUA)*, 82:3688-3692 (1985); EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949.

La composición farmacéutica a usarse para la administración *in vivo* típicamente debe ser estéril. Esto se puede lograr mediante la filtración a través de las membranas de filtración estéril. Donde la composición se liofiliza, la esterilización que usa este método se puede conducir ya sea antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral se puede almacenar en forma liofilizada o en solución. Además, las composiciones parenterales se colocan generalmente dentro de un contenedor que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o frasquito de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que la composición farmacéutica se ha formulado, se puede almacenar en frasquitos estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o un polvo deshidratado liofilizado. Estas formulaciones se pueden almacenar ya sea en una forma lista para usar o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

En una modalidad específica, la presente invención se dirige a kits para la producción de una unidad de administración de una dosis. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca y un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa.

También se incluyen dentro del alcance de esta invención kits que contienen jeringas pre-llenadas de una y múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).

Una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que se emplea terapéuticamente dependerá, por ejemplo, en el contexto terapéutico y objetivo. Una persona experta en el campo apreciara que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variará de esta manera dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, la indicación por la cual la molécula de agente de enlace está siendo usado, la vía de administración, y el tamaño (peso corporal, superficie corporal u tamaño de órgano) y condición (la edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar de aproximadamente 0.1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras modalidades, la dosificación puede variar de 0.1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente ya sea en los

ensayos de cultivo celular o en modelos de animal tales como ratones, ratas, conejos, perros o cerdos. Un modelo de animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiado y vía de administración. Esta información luego se puede usar para determinar las dosis útiles y vías para la administración en humanos.

La dosificación exacta se determinará en vista de los factores relacionados con el sujeto que requiere el tratamiento. La dosis y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de compuesto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tomar en cuanta incluyen la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso, y género del sujeto, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) de fármacos, sensibilidades de reacción y respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o cada dos semanas dependiendo de la vida media y velocidad de eliminación de la formulación particular.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de agente de enlace en la formulación usada. Típicamente, se administra una composición hasta que una dosificación se alcanza lo

que logra el efecto deseado. La composición se puede administrar además como una sola dosis, o múltiples dosis (en la misma o diferentes concentraciones/dosificaciones) a través del tiempo, o como una infusión continua. Se hace rutinariamente el refinamiento adicional de la dosificación apropiada. Las dosificaciones apropiadas se pueden estimar a través del uso de datos de respuesta de dosis apropiados.

La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, oralmente, a través de la inyección por vías intravenosas, intraperitoneales, intracerebrales (intra-parenquimales), intracerebroventriculares, intramusculares, intra-oculares, intra-arteriales, intraportales, rutas intralesionales, intramedularmente, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, uretral, vaginal, o medio rectal, mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. Donde se desea, las composiciones se pueden administrar por inyección de bolo o continuamente por infusión o por dispositivo de implante.

Alternativa o adicionalmente, la composición se puede administrar localmente por la vía de la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el

cual la molécula deseada se ha absorbido o encapsulado. Donde se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo se puede implantar dentro de un tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser por la vía de difusión, bolo de libración cronometrada o administración continua.

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

En otros casos, un agente de enlace que es un polipéptido se puede suministrar al implantar ciertas células que se han diseñado genéticamente, usando métodos tales como aquellos descritos en este documento, para expresar y secretar el polipéptido. Estas células pueden ser células de animal o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogenéicas. Opcionalmente, las células se pueden inmortalizar. A fin de disminuir el riesgo de una respuesta inmunológica, las células se pueden encapsular para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente encierros o membranas poliméricas biocompatibles, semipermeables que

permiten la liberación del producto(s) de proteínas pero previene la destrucción de las células por el sistema inmune del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

Terapia de Combinación

Los agentes de enlace específicos de la invención se pueden usar en combinación con otro producto terapéutico en el tratamiento de patologías Ang-1 y/o Ang-2. Estos otros productos terapéuticos incluyen, por ejemplo tratamiento de radiación, agentes quimioterapéuticos, así como también otros factores o inhibidores de crecimiento.

El tratamiento de quimioterapia puede emplear agentes anti-neoplásicos que incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes que incluyen: mostazas de nitrógeno, tal como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan y clorambucil; nitrosoureas, tal como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), y semustina (metil-CCNU); etileniminas/metilmelamine tal como trietilenmelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametilmelamina (HMM, altretamina); sulfonatos de alquilo tal como busulfano; triazinas tal como dacarbazina (DTIC); antimetabolitos que incluyen análogos de ácido fólico tal como metotrexato y trimetrexato, análogos de

pirimidina tal como 5-fluorouracilo, fluorodeoxiuridina, gemcitabina, arabinosido de citosina (AraC, citarabina), 5-azacitidina, 2,2'-difluorodeoxicitidina, análogos de purina tal como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-deoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA); productos naturales que incluyen fármacos antimitóticos tal como paclitaxel, alcaloides de la vinca que incluyen vinblastina (VLB), vincristina y vinorelbina, taxotere, estramustina y fosfato de estramustina; pipodofilotoxinas tal como etopósido y tenipósido; antibióticos tal como actimomicina D, daunomicina (rubidomicina), doxorubicina, mitoxantrona, idarubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C, y actinomicina; enzimas tal como L-asparaginasa; modificadores de respuesta biológica tal como interferón-alfa, IL-2, G-CSF y GM-CSF; agentes diversos que incluyen complejos de coordinación de platino tal como cisplatino y carboplatino, antracenedionas tal como mitoxantrona, urea sustituida tal como hidroxiurea, derivados de metilhidrazina que incluyen N-metilhidrazina (MIH) y procarbazina, supresores adrenocorticales tal como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas que incluyen antagonistas de adrenocorticosteroides tal como prednisona y equivalentes,

dexametasona y aminoglutetimida; progestina tal como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol; estrógeno tal como dietilstilbestrol y equivalentes de estradiol de etinilo; antiestrógeno tal como tamoxifeno; andrógenos que incluyen propionato de testosterona y fluoximesterona/equivalentes; antiandrógenos tal como flutamida, análogos de la hormona de liberación de gonadotropina y leuprolido; y antiandrógenos no esteroidales tal como flutamida.

La terapia de combinación se puede hacer en conjunción con los factores de crecimiento listados posteriormente o con agentes que se diseñan para inhibir los factores de crecimiento listados posteriormente. Los factores de crecimiento incluyen citocinas, linfocinas, factores de crecimiento, u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoietina, factor de células madre y eritropoietina. Otras composiciones que se pueden incluir son conocidas como angiopoietinas, por ejemplo Ang-1, -2, -4, -Y, y/o el polipéptido similar a Ang humano, y/o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los factores de crecimiento incluyen angiogenina, proteína-1

morfogénica ósea, proteína-2 morfogénica ósea, proteína-3 morfogénica ósea, proteína-4 morfogénica ósea, proteína-5 morfogénica ósea, proteína-6 morfogénica ósea, proteína-7 morfogénica ósea, proteína-8 morfogénica ósea, proteína-9 morfogénica ósea, proteína-10 morfogénica ósea, proteína-11 morfogénica ósea, proteína-12 morfogénica ósea, proteína-13 morfogénica ósea, proteína-14 morfogénica ósea, proteína-15 morfogénica ósea, receptor de 1A de la proteína morfogénica ósea, receptor de 1B de la proteína morfogénica ósea, factor neurotrópico derivado del cerebro, factor neutrófico ciliar, receptor del factor neutrófico ciliar, factor-1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor-2 quimiotáctico, de neutrófilos inducido por citocinas, factor-2 quimiotáctico de neutrófilos inducidos por citocinas, factor de crecimiento de células endoteliales, endotelina-1, factor de crecimiento epidérmico, atrayente de neutrófilos derivados epiteliales, factor-4 de crecimiento de fibroblasto, factor-5 de crecimiento de fibroblasto, factor-6 de crecimiento de fibroblasto, factor-7 de crecimiento de fibroblasto, factor-8 de crecimiento de fibroblasto, factor-8B de crecimiento de fibroblasto, factor-8c de crecimiento de fibroblasto, factor-9 de crecimiento de fibroblasto, factor-10 de crecimiento de fibroblasto, factor de crecimiento de fibroblasto ácido,

factor de crecimiento de fibroblasto básico, receptor-1 del factor neutrófico derivado de la línea de células gliales, receptor-2 del factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales, proteínas relacionada con el crecimiento, proteína-2 relacionada con el crecimiento, proteína-3 relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de enlace de heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor del factor del crecimiento de hepatocitos, factor I de crecimiento similar a insulina, receptor del factor de crecimiento similar a insulina, factor II de crecimiento similar a insulina, proteína de enlace del factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor-1 del factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor del factor crecimiento nervioso, neurotrofina-3, neurotrofina-4, factor de crecimiento de placenta, factor-2 de crecimiento de placenta, factor de crecimiento de células endoteliales derivadas de plaquetas, factor de crecimiento derivados de plaquetas, cadena del factor A del crecimiento derivado de plaquetas, factor AA del crecimiento derivado de plaquetas, factor AB del crecimiento derivado de plaquetas, cadena del factor B del crecimiento derivado de plaquetas, factor BB del crecimiento derivado de plaquetas, receptor-1 del factor

de crecimiento derivado de plaquetas, receptor-2 del factor de del crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre, receptor del factor de células madre, factor-1 de crecimiento transformante, factor-2 de crecimiento transformante, factor-2 de crecimiento transformante, factor-3 de crecimiento transformante, factor-1.2 de crecimiento transformante, factor-4 de crecimiento transformante, factor-5 de crecimiento transformante, factor-1 de crecimiento transformante latente, proteína I de enlace del factor de crecimiento transformante, proteína II de enlace del factor de crecimiento transformante, proteína III de enlace del factor de crecimiento transformante, receptor del factor de necrosis tumoral tipo I, receptor del factor de necrosis tumoral tipo II, receptor del activador de plasminógeno de tipo de urocinasa, factor de crecimiento endotelial vascular, y proteínas quiméricas y fragmentos biológicamente o inmunológicamente activos de las mismas.

La terapia de combinación también se puede lograr con un agente de enlace específico de la presente invención, tal como un anticuerpo, en combinación con un inductor apoptótico tal como un agente de enlace específico (por ejemplo, un anticuerpo agonístico o ligando TRAIL) que induce la apoptosis por la vía del receptor DR4 (TRAIL R-

1) y/o DR5 (TRAIL R-2). Ejemplos de estos agentes de enlace específicos se proporcionan en el documento WO 2007/027713, incorporado en este documento a manera de referencia, el cual da a conocer anticuerpos agonísticos que inducen la apoptosis por la vía del receptor de DR5.

Inmunoterapéuticos

Los inmunoterapéuticos dependen generalmente del uso de células inmunoefectoras y moléculas que fijan como objetivo y destruyen células cancerosas. Los inmunoefectores pueden ser, por ejemplo un anticuerpo de la presente invención que reconoce algún marcador sobre la superficie de una célula objetivo. El anticuerpo solo puede servir como un efector o terapia o puede reclutar otras células para efectuar actualmente el exterminio de células. El anticuerpo también se puede conjugar a un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, cadena de ricina A, toxina del cólera, toxina de pertusis, etcétera) y de esta manera puede servir simplemente como un agente objetivo.

De acuerdo con la presente invención, las formas mutantes de Ang-1 y/o Ang-2 se pueden fijar como objetivo por inmunoterapia ya sea anticuerpos o conjugado de anticuerpo de la invención. Se contempla particularmente que las composiciones de anticuerpos de la invención se

pueden usar en un procedimiento de terapia combinada en conjunción con terapia de objetivo Ang-2.

La inmunoterapia pasiva ha probado ser particularmente efectiva contra una variedad de cánceres. Véase, por ejemplo, el documento WO 98/39027.

Los siguientes ejemplos se proponen para propósitos de ilustración únicamente, y no se deben considerar de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Generación de Anticuerpos Madurados por Afinidad Contra Ang2 por Despliegue de Fagos

Estrategia General

Se empleó la aleatorización CDR para potenciar la actividad del anticuerpo Ang2, similar a los métodos previos (Chen Y et al., 1999 J Mol Biol (293)865-881; Yelton DE et al., 1995 J Immunol (155) 1994-2004; Yang W-P et al., 1995 J Mol Biol (254) 392-403). Brevemente, las regiones variables del anticuerpo Ang2 536 se clonaron dentro del vector pCES-1 modificado de TargetQuest (Dyax Corp, de Haard HJ et al 1999 J Biol Chem (274) 18218-30). Todas las regiones de CDR se dirigieron para aleatorización de cada residuo CDR por mutagénesis al usar

oligonucleótidos que contienen NNK. Después de la reacción de mutagénesis, se consultaron los clones de fagos para cada posición al usar ELISA para identificar las mutaciones benéficas (para métodos ver WO 2004/046306,WO 2003/03057134, y US 2003/0099647 A1, para referencias generales de anticuerpos de fagos, Marks JD et al., 1991 J Mol Biol (222) 581-597; Hoogenboom HR et al 1992 J Mol Biol (227) 381-388; Griffiths AD et al., 1993 EMBO J (12) 725-734; Vaughan TP et al., 1996 Nat Biotechnol (14) 309-314). Los clones con mutaciones benéficas fueron convertidos a anticuerpos completos. Los clones de cadena pesada se aparearon con clones de cadena ligera y el IgG resultante se probó por actividad de neutralización. Se caracterizaron además los 22 clones superiores.

A. <u>Construcción de la Plantilla de Fab Ab536</u>

Se clonaron las regiones variables del anticuerpo 536 dentro del vector pCES-1 al usar técnicas estándar de biología molecular (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª. Edición Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001). Los fragmentos de cadena ligera de longitud completa y variables de cadena pesada se generaron por PCR al usar los siguientes oligonucleótidos:

Reverso de cadena pesada: CCGCTGTGCCCCCAGAGGTGC

Delantero de cadena pesada:

ttttttccatggccgaggtccagctggtgcagtc

Reverso de cadena ligera:

TTTTTTGGCGCGCCTTATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCT

Delantero de cadena ligera:

tttttgtgcacttgacattgtgatgactcagtct

La región variable de cadena pesada se insertó entre los sitios de restricción, NcoI y BstEII. La cadena ligera de longitud completa se insertó entre los sitios de restricción, ApaLI y AscI. El constructo resultante se usó como una plantilla para la aleatorización de CDR.

B. Mutaciones CDR

El anticuerpo 536 como un Fab en el vector pCES-1 se maduró por afinidad por una mutagénesis dirigida al sitio por etapas al usar oligonucleótidos que llevan codones NNK (N=ATCG; K=GT) para cada una de las posiciones CDR. El Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange (Stratagene #200518-5) se usó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para identificar los fagos con enlace potenciado a Ang2, se llevó a cabo un ELISA de fagos con proteína humana Ang2 biotinilada recubierta a 2ug/ml en PBS encima de placas de 96 pozos Maxisorp (NUNC). Brevemente, después del bloqueo con leche al 2% en PBS, el cultivo de fagos de un día para el otro que se hicieron crecer con fago de ayuda fue incubado y

los fagos enlazados fueron detectados con anticuerpos anti-M13 conjugados con HRP (Pharmacia). Se comparó la señal de luminiscencia con relación al 536 Fab precursor, y se seleccionaron los clones con señal superior para análisis adicional.

C. Conversión de IgG del Fab de Fagos

Después del ELISA de fagos y el análisis de secuencias, 95 clones cada uno de la mutagénesis de cadena ligera y cadena pesada con enlace mejorado contra Ang2 se seleccionaron y convirtieron en IgG. Brevemente, las regiones variables de cada clon se amplificaron por PCR al usar un par de cebadores. Las secuencias de cebador para LC fueron CTG CTG CTG TGG CTG AGA GGT GCG CGC TGT GAT ATT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC y AAA AAA CGT ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CC. Los cebadores para HC fueron TTTTTTTTGCGCGCTGTGAGGTCCAGCTGGTGCAGTC y AAAAAAGGCACTA GAGACGGTGACCAGGGTTCC. Después de digerir con BssHII y BsiWI para LC, y BssHII y BsmBI para HC, se insertaron las regiones variables dentro de los vectores pcDNA3 que contienen la secuencia líder VK1 y la secuencia constante de Kappa humana e IgG1 humano al usar técnicas estándar de biología molecular. Cada mezcla de ligación se transformó en dos placas de 96 pozos de células competentes con oro XL10 (Stratagene), y la mezcla de transformación se hizo

crecer de un día para otro para la preparación de plásmido al día siguiente. Los ADN resultantes se formaron en pares con ADN de LC o HC 536 precursor relativo, y se transfectaron transitoriamente en células 293T en OPTI-MEM al usar Fugene6. Después de 7 días, los medios de las células transfectadas se recolectaron, y se cuantificó la concentración de IgG por ensayo Lance al usar anticuerpo anti-humano IgG (específico de Fc) etiquetado con europio y anticuerpo anti-humano IgG etiquetado con APC (Perkin Elmer).

D. Selección de los Clones IgG

Los medios acondicionados que contienen IgG se probaron en ensayo de neutralización HTRF para su efecto inhibidor de la interacción de Tie-2 ya sea con Ang1 o Ang2. A partir de la selección inicial, se recogieron clones 15LC y clones 11HC que demostraron actividad mejorada. El ADN de los clones seleccionados se preparó y confirmó por formación de secuencias. Luego la combinación de cada uno de los mutantes LC y HC, junto con el clon precursor 536, se transfectaron en dos placas de 96 sembradas con células 293T. Se recolectaron los medios acondicionados, y se analizaron para la concentración de IgG y el efecto inhibidor en el ensayo de neutralización Tie2. A partir de esta combinación, 22 clones

que contienen la mutación sencilla en cada LC y HC se seleccionaron para análisis adicional.

E. Expresión y Purificación de los Anticuerpos Humanos Ang2 Madurados por Afinidad en las Células CHO

Las células CS-9 usadas para transfección de los plásmidos de expresión de IgG anti-Ang2 son una línea celular CHO en suspensión libre de suero. Se derivaron al adaptar gradualmente las células CHO DXB-11 para crecer en medio libre de suero como se describe en Rasmussen et al, 1998 (Rasmussen, B., Davis, R., Thomas, J., Reddy, P. 1998. Isolation, characterization and recombinant protein expression in Veggie-CHO: A serum-free CHO host cell line. Cytotechnology. 28: 31-42). Las células DXB-11 son un derivado mutante deficiente en DHFR de las células CHO-K1. (Chasin and Urlaub, 1983; Urlaub and Chasin. 1980. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220.; Chasin L.A., Graf, L., Ellis, N., Lanzberg, M., Urlaub, G. 1982. Gene amplification in dihydro folate reductase deficient mutants. Schimke, R.T. (Ed.) Gene amplification; Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., p161-166.). CHO-K1 es una línea celular epiteloide aislada originalmente del ovario del hámster chino (Kao and Puck. Genetics of somatic mammalian cells. VII.

Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60: 1275-1281, 1968.).

Para derivar la línea celular hospedera CS-9, se hicieron crecer células DXB-11 en medios con una reducción gradual en el suero sobre 100 pasos para obtener células adaptadas libres de suero referidas como SF-CHO (Rasmussen et al, 1998). Las células SF-CHO se sub-clonaron posteriormente al limitar la clonación de dilución y se evaluaron los clones individuales. El clon CS-9 se seleccionó como la línea celular hospedera para la expresión de proteínas recombinantes y se formó en un banco en medio libre de suero. El banco se probó para agentes espontáneos y esterilidad y se encontró que estaba libre de agentes virales, micoplasma y microbianos. La línea celular hospedera, CS-9, es una línea celular CHO deficiente en DHFR auxotrófica para glicina, hipoxantina, y timidina (GHT). Los plásmidos pDC323 y pDC324 cada uno codifican una porción del ADNc de DHFR y los 2 plásmidos deben complementarse uno con el otro para expresar una molécula funcional DHFR por asociación de los 2 fragmentos DHFR in vivo.

Los siguientes veintidós anticuerpos, consisten cada uno de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (kappa o lambda) como se designan en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

Anticuerpo*	Cadena Pesada de Anticuerpos	Cadena Ligera de Anticuerpos
H6L7	H6 HC	L7 LC
H5L7	H5 HC	L7 LC
H4L13	H4 HC	L13 LC
H11L7	H11 HC	L7 LC
H10L7	H10 HC	L7 LC
H4L7	H4 HC	L7 LC
H5L6	H5 HC	L6 LC
H2L7	H2 HC	L7 LC
H5L8	H5 HC	L8 LC
H6L8	H6HC	L8 LC
H3L7	H3 HC	L7 LC
H5L4	H5HC	L4 LC
H4L12	H4 HC	L12 LC
H6L6	H6 HC	L6 LC
H4L2	H4 HC	L2 LC
H4L6	H4 HC	L6 LC
H4L4	H4 HC	L4 LC
H5L11	H5 HC	L11 LC
H5L1	H5 HC	L1 LC
H4L11	H4 HC	L11 LC
H5L12	H5 HC	L12 LC
H5L9	H5 HC	L9 LC

* Probados para enlace a hAng-2, mAng-2, y hAng-1 como se describen en la presente.

Las Tablas 3 y 4 establecen las secuencias y las SEQ ID NOs., de las cadenas pesada y ligera (kappa y lambda) de los 22 anticuerpos anti-Ang-1 y/o anti-Ang-2 convertidos a partir del

fago a anticuerpos IgG1 de longitud completa. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de los anticuerpos monoclonales se predijeron al usar la base de datos VBASE la cual usa la técnica descrita por Kabat et al in: *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (NIH Publication No. 91-3242; U.S. Dept. Health and Human Services, 5th ed.). Las regiones Fab se alinearon a las secuencias en la base de datos con la secuencia de línea germinal más cercana, y luego comparadas visualmente con tales secuencias. Las CDRs para cada región variable (cadena pesada o ligera), tanto residuos y secuencias se establecen en la Tabla 5.

Tabla 3

Regiones Variables de Cadena Pesada

HC de anticuerpo	Secuencia
536 HC (Ref)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLDYDILTGYGYWGQGTLVTVSS
H2 (SEQ ID NO. 1)	evqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssygmhwvrqapgkglewv syisssgstieyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyyc ardlldydiltgygywgqgtlvtvss
H3 (SEQ ID NO. 2)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIQYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLDYDILTGYGYWGQGTLVTVSS
H4 (SEQ ID NO. 3)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLDYDLLTGYGYWGQGTLVTVSS

H6 (SEQ ID NO. 4)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLDYDIYTGYGYWGQGTLVTVSS
H10 (SEQ ID NO. 5)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLDYDILTGYGLWGQGTLVTVSS
H11 (SEQ ID NO. 6)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLDYDILTGYGMWGQGTLVTVSS
H5P (SEQ ID NO. 7)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLLDYDIWTGYGYWGQGTLVTVSS

Tabla 4

Regiones Variables de Cadena Ligera

LC de Anticuerpo	**Secuencia**
536 kappa (Ref)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTHWPPTFGQGTKLEIK
L1 (SEQ ID NO. 8)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSIQSLLQSNGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTHWPPTFGQGTKLEIK
L2 (SEQ ID NO. 9)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLLSNGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTHWPPTFGQGTKLEIK
L4 (SEQ ID NO. 10)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSHGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTHWPPTFGQGTKLEIK
L6 (SEQ ID NO. 11)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSVGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTHWPPTFGQGTKLEIK

L7 (SEQ ID NO. 12)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNFLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTHWPPTFGQGTKLEIK
L8 (SEQ ID NO. 13)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNMLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTHWPPTFGQGTKLEIK
L9 (SEQ ID NO. 14)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYAGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTHWPPTFGQGTKLEIK
L11 (SEQ ID NO. 15)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSDRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTHWPPTFGQGTKLEIK
L12 (SEQ ID NO. 16)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QATHWPPTFGQGTKLEIK
L13 (SEQ ID NO. 17)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QVTHWPPTFGQGTKLEIK

TABLA 5

REGIONES DETERMINANTES DE LA COMPLEMENTARIEDAD (CDRS) DE CADENAS PESADAS (HC) Y CADENAS LIGERAS (LC) DE LOS ANTICUERPOS ANG-1 Y/O ANG-2; RESIDUOS Y SECUENCIA

	CDR 1		CDR 2		CDR 3	
Anticuerpo	Residuos	Secuencia	Residuos	Secuencia	Residuos	Secuencia
Ab 536 HC	31-35	SYGMH	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG	99-111	DLLDYDILTGYGY
Ab 536 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD	55-61	LGSNRAS	94-102	MQGTHWPPT
H6L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI*Y*TGYGY (SEQ ID NO. 32)
H6L7 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYN*F*LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI*W*TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L7 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYN*F*LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L13 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD*L*LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L13 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQ*V*THWPPT (SEQ ID NO. 36)
H11L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDILTG*M*GY (SEQ ID NO. 37)
H11L7 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYN*F*LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H10L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDILTG*L*GY (SEQ ID NO. 38)
H10L7 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYN*F*LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD*L*LTGYGY (SEQ ID NO. 35)

	CDR 1		CDR 2		CDR 3	
Anticuerpo	**Residuos**	**Secuencia**	**Residuos**	**Secuencia**	**Residuos**	**Secuencia**
H4L7 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYN***F***LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L6 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI***W***TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L6 LC	24-39	RSSQSLLHS***V***GYNYLD (SEQ ID NO. 21)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H2L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTI***E***YADSVKG (SEQ ID NO. 28)	99-111	DLLDYDILTGYGY (SEQ ID NO.39)
H2L7 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYN***F***LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L8 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI***W***TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L8 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYN***M***LD (SEQ ID NO. 22)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H6L8 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI***Y***TGYGY (SEQ ID NO. 32)
H6L8 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYN***M***LD (SEQ ID NO. 22)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H3L7 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTI***Q***YADSVKG (SEQ ID NO. 29)	99-111	DLLDYDILTGYGY (SEQ ID NO.39)
H3L7 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYN***F***LD (SEQ ID NO. 19)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L4 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI***W***TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L4 LC	24-39	RSSQSLLHS***H***GYNYLD (SEQ ID NO. 23)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)

	CDR 1		CDR 2		CDR 3	
Anticuerpo	**Residuos**	**Secuencia**	**Residuos**	**Secuencia**	**Residuos**	**Secuencia**
H4L12 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD***L***LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L12 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQ***A***THWPPT (SEQ ID NO. 40)
H6L6 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI***Y***TGYGY (SEQ ID NO. 32)
H6L6 LC	24-39	RSSQSLLHS***V***GYNYLD (SEQ ID NO. 21)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L2 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD***L***LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L2 LC	24-39	RSSQSLL***L***SNGYNYLD (SEQ ID NO. 24)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L6 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD***L***LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L6 LC	24-39	RSSQSLLHS***V***GYNYLD (SEQ ID NO. 21)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L4 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYD***L***LTGYGY (SEQ ID NO. 35)
H4L4 LC	24-39	RSSQSLLHS***H***GYNYLD (SEQ ID NO. 23)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L11 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI***W***TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L11 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	LGS***D***RAS (SEQ ID NO. 30)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L1 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI***W***TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L1 LC	24-39	RS***I***QSLL***Q***SNGYNYLD (SEQ ID NO. 25)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H4L11 HC	31-35	SYGMH	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG	99-111	DLLDYD***L***LTGYGY

	CDR 1		CDR 2		CDR 3	
Anticuerpo	Residuos	Secuencia	Residuos	Secuencia	Residuos	Secuencia
		(SEQ ID NO. 18)		(SEQ ID NO. 26)		(SEQ ID NO. 35)
H4L11 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	LGS***D***RAS (SEQ ID NO. 30)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)
H5L12 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI***W***TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L12 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	LGSNRAS (SEQ ID NO. 27)	94-102	MQ***A***THWPPT (SEQ ID NO. 40)
H5L9 HC	31-35	SYGMH (SEQ ID NO. 18)	50-66	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 26)	99-111	DLLDYDI***W***TGYGY (SEQ ID NO. 34)
H5L9 LC	24-39	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO. 20)	55-61	***A***GSNRAS (SEQ ID NO. 31)	94-102	MQGTHWPPT (SEQ ID NO. 33)

EJEMPLO 2

Ensayos Moleculares para Evaluar los Anticuerpos Ang-2

Se desarrollaron ensayos moleculares (ELISA de afinidad, ELISA de neutralización y BIAcore) para evaluar el enlace directo de anticuerpos al Ang-2 y miembros relacionados de la familia (por ejemplo, Ang-1), y el efecto de los anticuerpos sobre la interacción Ang-2:Tie2. Estos ensayos basados en células e *in vitro* se describen como siguen.

A. ELISA de Afinidad

Para la selección inicial de los anticuerpos candidato anti-Ang-2, se usaron Ang-2 humano purificado (R and D

Systems, Inc; número de catálogo 623-AN; Ang-2 se proporciona como una mezcla de 2 versiones truncadas) o un polipéptido murino Ang-2 (preparado como se describe anteriormente). Para los ensayos confirmatorios por afinidad, se obtuvo Ang-2 humana de medios acondicionados de células humanas 293T transfectadas con el ADN de Ang-2 humano de longitud completa DNA y se cultivaron en DMEM libre de suero que contiene alrededor de 50 microgramos por ml de albúmina de suero de bovino (BSA).

Al usar placas de microtitulación, aproximadamente 100 microlitros por pozo de Ang-2 se agregaron a cada pozo y las placas se incubaron alrededor de 2 horas, después de lo cual las placas se lavaron con solución salina amortiguada de fosfato (PBS) que contiene alrededor de 0.1 por ciento Tween-20 cuatro veces. Los pozos luego se bloquearon al usar alrededor de 250 microlitros por pozo de alrededor de 5 por ciento BSA en PBS, y las placas se incubaron a temperatura ambiente por alrededor de 2 horas. Después de la incubación, se descartó la solución de bloqueo en exceso, y alrededor de 100 microlitros de anticuerpo candidato anti-Ang-2 se agregaron a cada pozo en una serie de dilución que inicia a una concentración de alrededor de 40 nanomolar y luego se diluyeron en serie cuatro veces en PBS que contiene alrededor de 1 por ciento de BSA. Luego se incubaron las placas durante la noche a

temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron con PBS que contiene alrededor de 0.1 por ciento Tween-20. El lavado se repitió cuatro veces adicionales, después de lo cual se agregaron alrededor de 100 microlitros por pozo de IgG(Fc)-HRP anti-humano de cabra (Pierce Chemical Co., catálogo # 31416) diluido previamente 1:5000 en PBS que contiene 1 por ciento de BSA (albúmina de suero de bovino). Se incubaron las placas aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavaron las placas cinco veces en PBS que contiene alrededor de 0.1 por ciento Tween-20, después de lo cual se agregaron alrededor de 100 microlitros por pozo de sustrato de TMB (Sistema de Sustrato Líquido de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina; Sigma chemical Company, St. Louis, MO, número de catálogo T8665) y las placas se incubaron alrededor de 5-15 minutos hasta que se desarrolló el color azul. Luego se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a alrededor de 370 nm.

B. <u>ELISA de Neutralización</u>

Las placas de microtitulación a las cuales se enlazó el polipéptido humano Ang-2 se prepararon como se describe para el ELISA de Afinidad. Los anticuerpos candidatos de anti-Ang-2 se prepararon en diluciones en serie como se describe para el ELISA de Afinidad anterior, en una

solución de PBS que contiene alrededor de 1 por ciento BSA y alrededor de 1 nM de Tie2 (suministrado como una molécula Tie2-Fc donde la porción de Tie2 contiene solamente la porción extracelular soluble de la molécula; R and D Systems, número de catálogo 313-TI). Después de que se agregaron alrededor de 100 microlitros de la solución de anticuerpo /Tie2 a cada pozo, las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente, y luego se lavaron cinco veces en PBS que contiene alrededor de 0.1 por ciento de Tween-20. Después del lavado, se agregaron alrededor de 100 microlitros por pozo de anticuerpo anti-Tie2 (Pharmingen Inc., catálogo # 557039) hasta una concentración final de alrededor de 1 microgramo por ml y las placas se incubaron alrededor de 1 hora a temperatura ambiente luego se lavaron cinco veces en PBS que contiene alrededor de 0.1 por ciento Tween-20. A continuación, se agregaron alrededor de 100 microlitros por pozo de IgG-HRP anti-ratón de cabra (Pierce Chemical CO., catálogo # 31432) a una dilución de 1:10,000 en PBS que contiene alrededor de 1 por ciento BSA. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante alrededor de 1 hora, después de lo cual se lavaron cinco veces con PBS que contiene alrededor de 0.1 por ciento Tween-20. Alrededor de 100 microlitros por pozo del sustrato TMB (antes descrito) luego se agregó y se permitió que se

desarrollara el color. Luego se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 370 nm.

C. BIAcore de Afinidad

Se llevó a cabo un análisis de afinidad de cada anticuerpo candidato Ang-2 en un BIAcore®2000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) con PBS y 0.005 por ciento de surfactante P20 (BIAcore, Inc.) como amortiguador en circulación. La Proteína G Recombinante (Repligen, Needham, MA) se inmovilizó a un chip sensor CM5 grado investigación (Biacore, Inc.) por medio de grupos amina primarios al usar el Kit de Acoplamiento a Aminas (Biacore, Inc.) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante.

Los ensayos de enlace se llevaron a cabo al colocar primero alrededor de 100 Ru de cada anticuerpo candidato anti-Ang-2 de la Proteína G inmovilizada, después de los cual diversas concentraciones (0-100 nM) de huAng-2 o mAng-2 se inyectaron luego sobre la superficie del anticuerpo enlazado a una relación de flujo de alrededor de 50 ul/min por alrededor de 3 minutos. La cinética de enlace de anticuerpos incluyendo k_a (constante de velocidad de asociación), k_d (constante de velocidad de disociación) y K_D (constante de disociación en equilibrio) se determinaron al usar el programa de cómputo de evaluación

BIA 3.1 (BIAcore, Inc.). Las constantes inferiores de disociación en equilibrio indicaron una mayor afinidad del anticuerpo para Ang-2.

Todos los veintidós anticuerpos y un control negativo IgG1 (referido como RDB1) se probaron al usar ELISA de afinidad y neutralización (como se describe en el Ejemplo 3 anterior) así como el ensayo de neutralización BIAcore para determinar sus capacidades de afinidad, neutralización, y especificidad. Los resultados se establecen a continuación (Tabla 2) y se calcularon al usar procedimientos estándar. Tres anticuerpos, H6L7, H4L4 y H4L11 se evaluaron para concentraciones que neutralizan IC50 contra el Ang-1 y Ang-2 humano y murino, al usar el análisis ELISA antes descrito. Todos los tres anticuerpos se mostraron que reaccionan de forma cruzada con Ang1 y Ang2 de ratón, conejo, y mono cinomolgo, mostrando potencias similares a través de los ortólogos de angiopoietina. Los resultados se reportan en la siguiente Tabla 3.

D. <u>IC50s e IC90s del Anticuerpo HTRF hAng-1 y hAng-2</u>

Un volumen igual de 1.6nM de estreptavidina-Europio (SA-EU) y 8nM de angiopoietina 2 biotinilada (del laboratorio) o angiopoietina 1 biotinilada (R&D Cat# BAF923) se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la

obscuridad con rotación en un tubo cónico de 15ml (Fisher 352096). Luego 50ul de la mezcla anterior de SA-EU/Biotinilada Ang 2(1) se agregó a cada pozo en una Placa de Mezclado (Costar 3356). Se agregaron a la Placa de Mezclado, 50ul de anticuerpo serial diluido Ang1 y Ang2 a concentraciones finales 4x a cada pozo. La Placa de Mezclado luego se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador en la obscuridad. Sobre la Placa de Ensayo (Costar 3356), se agregaron 20ul de 10nM huTie-2-Fc-APC (Prozyme Lote a la Medida# DF99-048) a cada pozo. Luego 20ul de la mezcla de cada pozo sobre la Placa de Mezclado se transfirieron a cada pozo sobre la Placa de Ensayo. La Placa de Ensayo se incubó a temperatura ambiente por 2 horas en la obscuridad con rotación. Luego la Placa de Ensayo se leyó en un lector de placas RUBYstar (BMG labtechnologies, INC). Todos los reactivos en el ensayo se diluyeron con solución amortiguadora HTRF (50mM Tris HCl, 100mM NaCl, 0.1% BSA y 0.05% Tween 20). Se calcularon el IC50 e IC90 con GRAFIT 5.0.

Tabla 6

Potencia Bioquímica de los Anticuerpos Contra hAng1 y hAng2

Anticuerpo	IC50 hAng1	IC90 hAng1	IC90/IC50	IC50 hAng2	IC90 hAng2	IC90/IC50
H6L7	0.06	0.49	8.0	0.06	0.19	3.3
H5L7	0.07	0.42	6.3	0.07	0.23	3.6
H4L13	0.15	1.6	11	0.06	0.19	3.2
H11L7	0.15	1.2	8.1	0.06	0.20	3.2
H10L7	0.15	2.2	14	0.06	0.19	3.4
H4L7	0.23	2.8	12	0.06	0.22	3.5
H5L6	0.32	3.6	11	0.07	0.23	3.4
H2L7	0.33	3.6	11	0.06	0.20	3.3
H5L8	0.37	3.6	10	0.07	0.21	3.1
H6L8	0.57	7.7	13	0.05	0.19	3.6
H3L7	0.58	7.1	12	0.06	0.23	4.0
H5L4	0.60	11	19	0.07	0.21	2.8
H4L12	0.63	8.7	14	0.06	0.21	3.4
H6L6	0.66	10	16	0.06	0.20	3.4
H4L2	0.66	6.8	10	0.06	0.19	3.1
H4L6	0.74	15	20	0.06	0.20	3.2
H4L4	0.87	8.2	9.4	0.06	0.16	2.7
H5L11	0.97	18	18	0.08	0.25	3.3
H5L1	1.7	24	15	0.06	0.29	4.4
AMG 386*	2.6	106	41	0.03	0.13	4.1
AMG 386*	3.9	278	71	0.03	0.15	4.4
H4L11	7.3	107	15	0.05	0.17	3.4
H5L12	14	159	11	0.07	0.31	4.4
H5L9	18	181	10	0.19	1.57	8.5

* Pepticuerpo

EJEMPLO 3:

Caracterización Molecular de los Anticuerpos de Angiopoietina

Cuatro de los anticuerpos IgG2 completamente humanos (Ab536, H4L4, H6L7, y H4L11) con actividad inhibidora potente hAng2 y un intervalo de actividades inhibidoras hAng1 se seleccionaron para estudios posteriores. Todos los 4 anticuerpos demostraron reaccionar de forma cruzada con Ang1 y Ang2 de ratón, conejo, y de mono cinomolgo, que muestran potencias similares a través de ortólogos de angiopoietina (Tablas 7 y 8).

Tabla 7

Potencia Bioquímica de Anticuerpos de Angiopoietina Contra Ortólogos de Ang2

Clon	IC50 de Ang2 humano (nM)	IC50 de Ang2 de cino (nM)	IC50 de Ang2 Murino (nM)	IC50 de Ang2 de conejo(nM)
H6L7	0.22	0.19	0.13	0.15
H4L4	0.22	0.24	0.15	0.15
AMG 386	0.12	0.17	0.10	0.10
H4L11	0.21	0.16	0.12	0.12
536 LC1	0.27	0.19	0.14	0.20

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

Tabla 8

Potencia Bioquímica de Anticuerpos de Angiopoietina Contra Ortólogos de Ang1

Clon	IC50 de Ang1 humano (nM)	IC50 de Ang1 de cino (nM)	IC50 de Ang1 Murino (nM)	IC50 de Ang1 de conejo(nM)
H6L7	0.12	0.19	0.12	0.18
H4L4	3.2	4.0	3.3	2.8
AMG 386	1.2	2.9	2.7	4.3
H4L11	17	14	7.7	16
536 LC1	515	531	305	502

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

EJEMPLO 4:

Actividad de Anticuerpos de Angiopoietina en el Tumor Colo205 de Xenoinjertos.

Tres anticuerpos (H6L7, H4L4 y H4L11) se evaluaron en el modelo de xenoinjerto de carcinoma colorectal humano Colo205. Para cada grupo del estudio, los ratones se inyectaron hipodérmicamente en el costado derecho con 2 x 10^6 células en Matrigel™. Se asignaron diez animales aleatoriamente con un volumen del tumor promedio de 300 mm^3 a cada grupo experimental. Los animales se inyectaron con IP dos veces por semana, empezando en el día 17 posterior a la implantación, con 300 µg de los anticuerpos dirigidos a la angiopoietina o isotipo de anticuerpo de control. AMG 386 a la dosis biológica óptima (OBD) en este modelo de 14 µg (SC) dos veces el por semana se incluyó como un control positivo y el anticuerpo 536LC1 se incluyó en 300 µg dos veces por semana. El peso corporal y tamaño del tumor se midieron dos veces semanalmente.

Como se muestra en la Figura 1, todos los tres anticuerpos inhibieron significativamente el crecimiento del tumor comparado con el tratamiento con un isotipo del anticuerpo de control ($p < 0.0001$). El tratamiento con H6L7 y H4L4, produjo una inhibición significativamente mayor de crecimiento del tumor comparada con 536LC1. Los datos representan ± SEM medio. Al final del experimento, los

tumores se cosecharon, se fijaron en cinc-formalina y se incrustaron con parafina. Las secciones histológicas de tumor se tiñeron con hematoxilina. El fragmento del tumor viable fue estimado entonces, usando umbralización RGB y conteo de pixeles automatizado, desde una imagen 1x digital de la sección transversal del tumor entero. La carga del tumor viable se calculó como la fracción viable multiplicada por el peso del tumor terminal. Los datos representan la ± SEM media (n=10). La Figura 2 demuestra que los anticuerpos H6L7, H4L4 y H4L11 también reducen significativamente la carga del tumor relativa al control ($p < 0.0001$), que sugiere que las mediciones del tumor basadas en el volumen subestimaron el efecto anti-tumor de los anticuerpos.

La histopatología se realizó en los tumores y en los tejidos normales de los ratones en el estudio mostrado en las Figuras 1 y 2. El tratamiento de ratones sin pelo que incluye xenoinjertos con inhibidores de angiopoietina (AMG 386, 536LC1, H4L4, H4L11, o H6L7) no obtuvo efectos anatómicos adversos en tejidos no dirigidos

EJEMPLO 5

Efecto de Anticuerpos Anti-Ang-1 y/o Ang-2 en la Proliferación celular Endotelial

En un experimento paralelo, los animales con aproximadamente 400 mm^3 de tumores se trataron con 536LC1

(AKA LC1), H4L11, H4L4, H6L7, AMG 386 o control IgG2 durante 72 hrs. Diecisiete horas previo al sacrificio, los animales fueron implantados con minibombas osmóticas que contiene 3 mg/mL BrdU. Luego del sacrificio, las células endoteliales se aislaron de los ratones que tienen el tumor Colo205 y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la proliferación. Las células disociadas se tiñeron con el anti-ratón CD45-FITC y anticuerpos CD31-PE, seguido por la fijación y tinción con los anticuerpos anti-BrdU-alexa647. Los datos representan la media ± SEM (n = 5). Como se muestra en la Figura 3, el tratamiento con todos los anticuerpos reducen significativamente el porcentaje de células positivas BrdU ($p < 0.002$ comparado con el control IgG2). Estos datos son consistentes con un mecanismo terapéutico anti-angiogénico en el que los anticuerpos angiopoietina dirigidos inhiben la proliferación celular endotelial del tumor in vivo.

EJEMPLO 6

Dosificación de la Titulación de H4L4 en el Tumor Colo205 de Xenoinjertos

El anticuerpo H4L4 se seleccionó para un análisis más extenso que explora la dependencia de la dosis de inhibición de crecimiento de tumor H4L4-mediada. Los animales se inyectaron con el IP de H4L4 al principio bisemanal en el día

14 a dosis que van de 3 µg a 300 µg. El AMG 386 a la dosis biológica óptima de 14 µg (SC) dos veces por semana se incluyó como un control positivo. Como se muestra en la Figura 4, todas las dosis de H4L4 inhibieron significativamente el crecimiento del tumor inhibido y la carga del tumor viable ($p < 0.0001$), con un OBD de ~ 30 µg en el análisis de carga del tumor viable (Figura 5.).

EJEMPLO 7

Efecto de H4L4 en el Tumor Colo205 de la Proliferación Celular Endotelial in vivo

En un experimento paralelo, los ratones que tienen el tumor Colo205 con tumores de aproximadamente 450 mm^3 se trataron con una sola dosis de H4L4, AMG 386 o control IgG2 durante 72 horas y después se analizaron como en la Figura 3. Como se muestra en la Figura 6, el tratamiento con H4L4 inhibió significativamente la proliferación celular endotelial de una manera dependiente de la dosis, con un OBD de 30 µg.

EJEMPLO 8

Farmacocinética de H4L4, H6L7, H4L11, y 536LC1 en Ratones, Ratas y monos Cinomolgos

La Farmacocinética (PK) de H4L4, H6L7, H4L11, y 536LC1 se ha caracterizado en ratones CD-1 después de dosis simple

intravenosa (IV) o administración intraperitoneal (IP). El PK de H4L4 y H6L7 también se caracterizó en ratas Sprague-Dawley y monos cinomolgos después de la administración IV de dosis simple.

Después de la dosis simple IV o administración IP a los ratones, la exposición de H4L4 parecía incrementar aproximadamente proporcionalmente la dosis en el rango de dosis de 0.1 a 10 mg/kg (Tabla 4). La media global de la vida media terminal ($t_{1/2,z}$), eliminación (CL), y volumen de distribución en el estado permanente (V_{ss}) fue 207 hrs, 0.43 mL/hr/kg, y 128 mL/kg, respectivamente. La biodisponibilidad (% F) después de la administración IP fue mayor que 90% para todos los grupos de dosis. En contraste, H6L7, H4L11, y 536LC1 exhibieron PK no lineales en ratones con una exposición que aumenta mayor que la dosis proporcionalmente de 0.1 a 10 mg/kg. La exposición de H6L7 en ratas y monos también se incrementa más que la dosis proporcionalmente después de una dosis simple IV de 0.1 a 10 mg/kg.

En contraste con su perfil PK lineal en ratones, H4L4 exhibió ratas y mono PK no lineales. El tiempo de residencia medio (MRT) en ratas se encuentra en el rango de 57 a 217 horas; el rango CL de 0.3 a 1.4 mL/hr/kg; el V_{ss} fue de 57 a 68 mL/kg. En los monos, el MRT se encontró en el rango de 40 a 163 horas; el CL se encontró en el rango de 0.4 a 1.9 mL/hr/kg; el Vss fue de 49 a 75 mL/kg.

El PK de H4L4 también se evaluó en ratones sin pelo que tienen tumores Colo205 de xenoinjertos en un estudio farmacológico de 3, 10, 30, 100 o 300 µg dosis/ratón, el IP se administró dos veces por semana durante 4 semanas. La exposición de H4L4 al suero se incrementó aproximadamente en una dosis proporcionalmente evaluada mediante concentraciones a través del suero. El PK de H4L4 en los ratones sin pelo fue similar a aquellos observados en ratones CD-1, y PK no parecieron cambiar con el tiempo.

Tabla 9

Parámetros PK de H4L4 y H6L7 en Especies Preclínicas

H4L4	Ratón			Rata			Mono		
Dosis (mg/kg)	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10
$t_{1/2,z}$ (hr)	196	180	244	42.5	66.7	213	36.2	35.6	80.1
MRT (hr)	259	273	420	57.4	107	217	40.1	52.0	163
CL (mL/hr/kg)	0.666	0.386	0.249	1.39	0.552	0.319	1.89	0.933	0.414
V_{ss} (mL/kg)	173	105	105	66.4	57.0	68.5	74.9	48.6	67.4
V_0 (mL/kg)	71.0	46.6	46.7	43.3	34.5	36.1	48.2	40.8	44.0

H6L7	Ratón			Rata			Mono		
Dosis (mg/kg)	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10
$t_{1/2,z}$ (hr)	8.27	99.0	82.8	9.43	25.8	92.9	10.4	32.6	65.0
MRT (hr)	11.6	54.3	263	13.2	41.2	158	15.1	51.8	158
CL (mL/hr/kg)	19.4	2.00	0.349	3.31	1.02	0.331	2.81	0.824	0.358
V_{ss} (mL/kg)	224	109	91.8	43.3	41.3	51.9	41.3	42.2	55.2
V_0 (mL/kg)	90.9	58.4	56.6	35.4	35.3	38.1	40.0	37.7	43.1

EJEMPLO 9

Neutralización de Angiopoietina-1 que media la Supresión dependiente en el Contexto de la Angiogénesis y Crecimiento del Tumor

Aun cuando la Angiopoietina-2 (Ang2) es un mediador importante de la angiogénesis postnatal, la función de la Angiopoietina-1 (Ang1) en este escenario es menos clara. Para investigar la función postnatal de Ang1, se han desarrollado pepticuerpos potentes y selectivos (proteínas de fusión de péptido Fc) que inhibe la interacción entre Ang1 y su receptor, Tie2. Se ha demostrado que el antagonismo Ang1 selectivo no tiene un efecto independiente en modelos de enfermedades asociadas con la angiogénesis (cáncer y retinopatía diabética), aunque puede inducir la atrofia ovárica en ratas juveniles normales e inhibir la angiogénesis folicular ovárica en un modelo de ovulación inducida por hormonas. Sorprendentemente, la actividad de inhibidores Ang1 parece ser descubierta en algunos modelos de la enfermedad cuando se combina con los inhibidores Ang2. La inhibición dual de Ang1 y Ang2 suprime cooperativamente la angiogénesis folicular ovárica y crecimiento del tumor del xenoinjerto; sin embargo, la inhibición de Ang1, desciende para aumentar la actividad de la inhibición de Ang2 suprimiendo la proliferación celular endotelial del tumor, la angiogénesis corneal y la angiogénesis retinal inducida por oxígeno. En

ningún caso, la inhibición de Ang1 mostró 1) conferir actividad superior a esa inhibición de Ang2 o inhibición de Ang1/Ang2 dual o 2) antagonizar los efectos de inhibición de Ang2. Estos resultados implican que Ang1 desempeña una función dependiente del contexto promoviendo la angiogénesis postnatal y la patología asociada a la angiogénesis.

Ang1 desempeña una función importante en la angiogénesis de desarrollo, pero su función en la neovascularización postnatal es menos clara. Ang1 ha demostrado mediar ambos efectos pro- y anti-angiogénicos en varios escenarios postnatales. Para investigar la función de Ang1 inhibiendo el Ang1 endógeno. Para ese fin, se han desarrollado pepticuerpos que neutralizan Ang1 y probado solos y en combinación con los inhibidores de Ang2 en modelos preclínicos de angiogénesis postnatal.

Se han generado pepticuerpos que neutralizan Ang1 para investigar la función funcional de Ang1 en la angiogénesis. Las colecciones del péptido que despliegan fagos fueron inmunoadsorbidas para identificar los péptidos que enlazan Ang1, pero no Ang2. Los clones resultantes se convirtieron en pepticuerpos expresando los péptidos en E. *coli* como fusiones a la porción Fc *de IgG1* humano. Los pepticuerpos fueron entonces separados por exclusión mediante un ensayo inmunoabsorbente enlazado a la enzima (ELISA) y los ensayos de fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRF) para

su capacidad de neutralizar la interacción entre Tie2 y las angiopoietinas. Uno de estos pepticuerpos fue madurado por afinidad para incrementar su capacidad de antagonizar Ang1, y un pepticuerpo resultante, mL4-3, se seleccionó para los estudios en la presente. ML4-3 exhibió potencia similar contra varios ortólogos de Ang1, y desplegó una selectividad > a 40,000 veces sobre Ang2 (Tablas 10 y 11). También se muestra en la Tabla 10 dos pepticuerpos previamente descritos: AMG 386 [también conocido como 2xCon4 (C)] y L1-7(N). L1-7(N) es un inhibidor de Ang2 muy potente y selectivo, y AMG 386 es un inhibidor dual de Ang1 y Ang2. Los perfiles farmacocinéticos de mL4-3 en los roedores fueron aceptables para dosificaciones diarias a semanales s.c (Tabla 3).

Puede usarse mL4-3 como un reactivo para consultar la función Ang1 in vivo. Para evaluar si mL4-3 fue capaz de secuestrar Ang1 selectivamente in vivo, mL4-3, L1-7(N), y Fc se administró s.c. a los ratones, seguido por una prueba inmunogénica i.v. con Ang1 recombinante. Ang1 indujo la fosforilación de Tie2 en el endotelio pulmonar (aproximadamente 5 veces), un efecto que podría prevenirse por mL4-3, pero no por L1-7(N) o Fc (Figura 7).

Después, se quiso determinar si mL4-3 podría neutralizar el Ang1 endógeno en un escenario en el que Ang1 se sabe desempeña una función fisiológicamente relevante. Los

estudios con genes inactivados genéticos de desarrollo han demostrado que la eliminación de Ang1 reduce el tamaño cardíaco y plegado endocardiaco en los embriones. En un esfuerzo por reproducir este fenotipo farmacológicamente, mL4-3 se administró a ratones preñados en gestación temprana y media. Los embriones se cosecharon en el día 12.5 embrionario, el momento en el que la letalidad se observó en los embriones de ratón Ang1-nulos. La valoración farmacocinética de lisados de embrión de ratón demostró un nivel medio a través de mL4-3 de 3.0 µg/g de tejido, confirmando que mL4-3 fue capaz de cruzar la placenta. El análisis histológico reveló el tamaño cardíaco reducido y trabeculación, similar a, pero menos dramático que el observado en los embriones Ang1 nulos (Figura 8). El fenotipo menos pronunciado de los embriones tratados con mL4-3 puede ser una consecuencia de las exposiciones mL4-3 embrionarias subóptimas y el secuestro Ang1 incompleto. No obstante, el mL4-3 induce claramente los defectos cardíacos embrionarios que copian el fenotipo de aquellos ratones con genes inactivados Ang1 genéticos, confirmando la utilidad de mL4-3 como un reactivo para investigar las funciones Ang1 in vivo.

El antagonismo de Ang1 incrementa el antagonismo de Ang2 suprimiendo el crecimiento del tumor. En un informe previo, se demostró que L1-7(N) se administró sistémicamente y AMG 386 fue capaz de inhibir el crecimiento de tumores Colo205 de

xenoinjertos implantados en ratones sin pelo. En ese estudio, los efectos antitumor de AMG 386 fueron modestamente superiores a aquéllos de L1-7(N) (P = 0.006). Para confirmar que la inhibición de Ang1/Ang2 dual confiere una mejor supresión de crecimiento del tumor que únicamente la inhibición de Ang2, se realizó un experimento similar, pero este grupos de tiempo tratados con mL4-3 o una combinación de mL4-3 y L1-7(N) también se probaron (Figura 9). El grupo del tratamiento AMG 386 y el grupo de tratamiento de combinación mL4-3/L1-7(N) demostró la eficacia del antitumor comparable; por otra parte, ambos grupos exhibieron eficacia superior a aquella mediada ya sea por L1-7(N) o mL4-3 exclusivamente. De hecho, mL4-3 no tuvo ningún efecto del agente simple discernible en el crecimiento del tumor, que implica que combinar el antagonismo de Ang2 con el antagonismo de Ang1 puede descubrir el efecto antitumor de la inhibición de Ang1. Los replicados adicionales de estos experimentos confirmaron que AMG 386 y la combinación mL4-3/L1-7(N) media la supresión de crecimiento del tumor más grande que únicamente L1-7(N) (datos no mostrados). Sin embargo, en una minoría de casos, estas diferencias no alcanzaron una importancia estadística, quizás porque reflejan la naturaleza sutil de la ventaja incremental conferida por la inhibición de Ang1/Ang2 dual sobre la inhibición de Ang2 selectiva. La inhibición de Ang1 selectiva no tuvo un efecto antitumor por sí mismo en

cualquiera de los experimentos en los que fue probado (Figura 9 y datos no mostrados).

El antagonismo de Ang2, pero no el antagonismo de Ang1, inhibe la proliferación celular endotelial del tumor, angiogénesis corneal, y la angiogénesis retinal. Se demostró previamente que esa inhibición de Ang1/Ang2 dual fue capaz de suprimir la proliferación celular endotelial del tumor Colo205 in vivo. Para investigar si este efecto se confirió a través de la inhibición de Ang1, inhibición de Ang2, o una combinación de los dos, los ratones que tienen el tumor Colo205 se trataron con mL4-3, L1-7(N), mL4-3/L1-7(N), o AMG 386. Como con la lectura del volumen del tumor descrita en la sección anterior, mL4-3 no tuvo un efecto de un agente simple en la proliferación celular endotelial del tumor, mientras que L1-7(N) fue inhibidor (Figura 10A). Curiosamente, sin embargo, la inhibición de Ang1/Ang2 dual no confirió un efecto mayor en la proliferación celular endotelial que únicamente la inhibición de Ang2 (Figura 10A), una observación que se ha reproducido repetidamente (datos no mostrados) y posiciones en contraste con los efectos aparentemente cooperativos de la inhibición de Ang1/Ang2 combinada en el tumor de crecimiento Colo205. Esta desigualdad implica que la represión de la proliferación celular endotelial es sólo un componente que yace debajo de la inhibición de crecimiento del tumor mediado por el

antagonismo de la angiopoietina.

Estos agentes se probaron después en dos modelos de angiogénesis ocular, uno que involucra la córnea y el otro que involucra la retina. La córnea normalmente es avascular, pero la angiogénesis patológica puede ocurrir en la córnea secundaria a las condiciones tal como la queratitis y rechazo de trasplante de córnea. El factor de crecimiento de fibroblasto básico y VEGF (bFGF)-se usaron modelos inducidos de angiogénesis corneal para probar las funciones del antagonismo Ang1 y Ang2 en la formación del neovaso. Como se observa con la proliferación celular endotelial, la angiogénesis corneal parecía ser dependiente en Ang2, pero no en Ang1 (Figura 10B y 10C). La misma conclusión podría deducirse de la evaluación de estos pepticuerpos que antagonizan a la angiopoietina en modelo retinal Tie2-dependiente de la angiogénesis en la que la neovascularización fue inducida por cambios en la tensión del oxígeno del ambiente (Figura 10D). Así, en tres escenarios preclínicos (proliferación celular endotelial, angiogénesis corneal, y angiogénesis retinal), la inhibición de Ang2 suprimió dramáticamente la formación del neovaso, mientras que la inhibición de Ang1 no tuvo efecto sola o en combinación con la inhibición de Ang2.

La inhibición selectiva de Ang1 o Ang2 induce la atrofia ovárica, pero no el espesor de la placa epifiseal. Para

evaluar los efectos de la inhibición de la angiopoietina en animales normales, las ratas se trataron sistémicamente con mL4-3, L1-7(N), o AMG 386 durante un mes. El AMG 386, como antagonistas de VEGF, se ha observado para inducir el espesamiento de la placa epifiseal y la atrofia ovárica, los efectos considerados ser consecuencias basadas en el mecanismo de terapia antiangiogénica. En el presente estudio, AMG 386 provocó el espesamiento de la placa epifiseal provocada en todos los animales tratados, mientras, que notablemente, L1-7(N) y mL4-3 fallaron para alterar la morfología epifiseal en cualquier rata (Tabla 13). Así, la inducción del espesamiento de la placa epifiseal parece requerir la inhibición de Ang1 y Ang2. En contraste llamativo, todos los tres pepticuerpos producen una atrofia ovárica en proporciones de incidencia similar, indicando que la inhibición selectiva de Ang1 o Ang2 es suficiente para inducir la atrofia ovárica.

Los inhibidores Ang2 y Ang1 suprimen cooperativamente la angiogénesis folicular ovárica. Para entender bien los efectos de inhibición de angiopoietina en el ovario, se empleó un modelo inducido por hormonas de la angiogénesis folicular ovárica que permite la valoración controlada de la neovascularización en ratones que nunca habían ovulado anteriormente. En este modelo, el suero de yegua preñada (PMS) y gonadotropina corionica de humano (HCG) se usó para

inducir la ovulación sincronizada rápida en folículos múltiples (Figura 11). Los ratones se trataron sistémicamente con el Fc control, mL4-3, L1-7(N), o una combinación de mL4-3/L1-7(N) para determinar los efectos de estos agentes en la formación del neovaso que transforma los folículos de Graafian. Se realizaron dos replicas idénticamente diseñadas de este experimento en días diferentes, y notablemente, ambos produjeron perfiles de actividad casi idéntica perfila con respecto a la inhibición del porcentaje de área del vaso sanguíneo (replica 1, replica 2): L1-7(N) (8% ,11%), mL4-3 (15%, 14%), mL4-3/L1-7(N) (24%, 26%). Todo el agente simple y combinación de grupos de pepticuerpos, con la excepción del grupo L1-7(N) en el Experimento 1, que media estadísticamente la inhibición significativa de la angiogénesis relativa al control Fc ($P < 0.05$) (Figura 11). Así, tanto la inhibición de la angiogénesis ovárica e inducción de atrofia ovárica podrían obtenerse inhibiendo Ang1, Ang2, o ambos, consistentes con la noción en la que la atrofia ovárica observada fue una consecuencia del desarrollo del neovaso frustrado.

Se demostró que la inhibición de Ang1 desempeña una función dependiente del contexto en la supresión de la angiogénesis en modelos de enfermedad preclínicos y en animales normales. En el útero, la inhibición farmacológica Ang1 parcialmente fenocopia la ablación genética de Ang1,

consistente con la función importante de Ang1 en la angiogénesis de desarrollo. Posnatalmente, el antagonismo Ang1 selectivo inhibió la angiogénesis ovárica y la atrofia ovárica inducida, efectos que también podrían lograrse inhibiendo Ang2 solo o Ang1 más Ang2 juntos. Sin embargo, en modelos de enfermedad postnatales, la inhibición de Ang1 tuvo poco efecto por sí mismo, aunque su actividad biológica pareció ser descubierta cuando se combinó con la supresión de Ang2. El mecanismo que subyace la dependencia diferencial en Ang1 en estos escenarios pretende ser determinado.

El ovario, en virtud de su función en el ciclo reproductivo, es uno de los pocos órganos que experimentan la angiogénesis normal en adultos. Basado en los patrones de expresión ováricos de Ang1 y Ang2 en ratas ovulando inducidas por hormonas, se ha propuesto que Ang2 desempeña una función temprana en la invasión del vaso, y Ang1 desempeña una función en la invasión temprana del vaso. Bajo esta hipótesis, Ang2 y Ang1 realizan funciones contrarias dónde Ang2 inicialmente desplaza Ang1 de Tie2, produciendo una desestabilización del vaso y angiogénesis. Este estado de plasticidad se invierte como consecuencia cuando Ang1 echa fuera a Ang2 del receptor para restablecer la inmovilidad y estabilidad vascular. En el conflicto con este modelo, los datos del estudio actual implican que ambos Ang1 y Ang2 desempeñan funciones pro-angiogénicos en el ovario.

En el modelo del tumor Colo205 de xenoinjerto, el antagonismo de Ang1 y Ang2 media la supresión del tumor más grande que se logró inhibiendo Ang1 o Ang2 individualmente, indicando que este modelo es dependiente en ambos angiopoietinas. Sin embargo, en el mismo modelo, sólo la inhibición de Ang2 fue capaz de sub-modular la proliferación celular endotelial del tumor, que sugiere que Ang1 no está involucrado en esta función. ¿Cuál es el conteo para las diferentes dependencias de estos dos criterios de evaluación en Ang1?. Una posibilidad es que esa inhibición de Ang1 tenga un efecto directo en las células del tumor. Esto parece improbable, sin embargo, dado que AMG 386, un inhibidor dual de Ang1 y Ang2, no tiene efecto en el crecimiento in vitro de células de tumor Colo205 cultivadas. Una segunda posibilidad es que el antagonismo de Ang1 desempeña una función anti-angiogénica que no se confiere a través de la inhibición de la proliferación celular endotelial, pero en cambio, a través de mecanismos que podrían impactar las funciones tales como la migración o invasión celular endotelial. Esta explicación podría ser aplicable si Ang1 y Ang2 mediaran cualitativamente o cuantitativamente señales diferentes a través de Tie2, o si Ang1 señalizara a través de receptores adicionales que no fueron sensibles a Ang2. Una tercera posibilidad es que señalizara a Ang1 a través de Tie2 en células no endoteliales, tales como los monocitos que expresan Tie2

(TEMs). Los TEMs se reclutan en los tumores, dónde se enraciman alrededor de los neovasos. La ablación selectiva de TEMs en ratones que tienen tumores suprime la angiogénesis de tumor e inhibe el crecimiento del tumor, y se ha postulado que los TEMs promueven la angiogénesis del tumor proporcionando señales de paracrina que estimulan a los neovasos. Quizás Ang1 estimula TEMs para liberar citoquinas pro-angiogénicas distintas a las angiopoietinas. En tal escenario, la inhibición de Ang1 podría tener un efecto anti-neovascular indirecto que podría complementar el efecto anti-angiogénico de la supresión de Ang2.

En contraste con los efectos que dependen del contexto y sutiles de la inhibición de Ang1, efectos que median frecuentemente la inhibición de Ang2 que fueron equivalentes o cercanamente equivalentes a aquéllos conferidos por el antagonismo combinado de Ang1 y Ang2, que implica que Ang2 puede ser la angiopoietina dominante involucrada en la angiogénesis postnatal. Ang1 parece ser la angiopoietina dominante involucrada en la angiogénesis prenatal, sugiriendo un cambio en la dependencia de estos dos factores próximos al tiempo de nacimiento. Nuestros inhibidores no antagonizan a Ang4, pero la relevancia funcional de este factor es incierta, dado su patrón de expresión de pulmón restringido.

Se ha demostrado que Ang1 y Ang2 ambos desempeñan funciones funcionales opuestas y similares en varios sistemas

in vitro e in vivo. La incapacidad para esbozar conclusiones consistentes a este respecto a través de publicaciones múltiples puede ser en parte una consecuencia de las diferentes condiciones bajo la cuales se examinó la pregunta. Estas diferencias incluyen la evaluación de 1) sistemas in vitro versus in vivo, 2) angiogénesis postnatal versus prenatal, 3) variando los lechos vasculares, 4) angiogénesis normal versus patológica, y 5) diseños experimentales pérdida de la función versus ganancia de la función. Esta diferencia final puede ser particularmente importante, como la adición de factores exógenos para un sistema ejemplar puede ser un medio fisiológicamente menos relevante para elucidar la función que remueve los factores endógenos. Quizás los experimentos publicados más informativos respecto a esto son aquellos en los que Ang1 y Ang2 se han eliminado genéticamente en la línea germinal de roedores. Estos estudios proporcionan una visión significativa de la función de desenvolvimiento de Ang1 y Ang2. Sin embargo, es más difícil examinar genéticamente la función postnatal in vivo de Ang1 y Ang2 sin la disponibilidad de sistemas con genes inactivados condicionales; el ratón con genes inactivados Ang1 constitutivo se muere en el útero (como hace el que tiene genes inactivados Ang2 constitutivo en alguna cepa antecedente), y el fenotipo postnatal del ratón con gen inactivado Ang2 sobreviviente puede estar influenciado por

los efectos residuales de la eliminación del gen de desarrollo. Al usar los inhibidores Ang1 y Ang2 farmacológicos para examinar las funciones postnatales de Ang1 y Ang2 in vivo, se han desechado estas cuestiones. Los resultados del estudio actual implican que Ang1 y Ang2 no se oponen funcionalmente entre sí en los sistemas postnatales, y en algunos casos, parecen actuar cooperativamente.

La angiogénesis patológica está asociada con los niveles de angiopoietina alterados en varias enfermedades, que incluyen el cáncer, retinopatía diabética, degeneración macular, artritis reumatoidea, osteoartritis, y psoriasis. Las intervenciones de angiopoietina dirigida en estas indicaciones terapéuticas pueden proporcionar beneficio clínico. Los datos presentados en la presente sugieren que, en algunos escenarios, la inhibición combinada de Ang1 y Ang2 puede proporcionar eficacia terapéutica superior a aquella mediada exclusivamente mediante el direccionamiento de Ang2.

Métodos

Selección de despliegue de fagos de péptidos que enlazan Ang1. Tres colecciones del fago filamentosas, TN8-IX (5×10^9 transformantes independientes), TN12-yo (1.4×10^9 transformantes independientes), y lineal (2.3×10^9 transformantes independientes) (Dyax S.A., Cambridge, MA), fueron usadas para seleccionar el fago que enlaza Ang1.

Después de la selección negativa en Dynabeads de estreptavidina (Corporación de Invitrogen, Carlsbad, CA) se bloqueó con 2% albúmina de suero bovino (BSA) o perlas cargadas con Ang 2 biotinilada (Sistemas R&D, Inc., Minneapolis, MN), los fagos restantes se incubaron con cuentas cargadas con Ang1 biotinilada (Sistemas R&D, Inc.). Después de un lavado extenso, el fago de cada ronda de selección se eluyó de manera no específica usando una solución de trietilamina 100 mM (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO). Los fagos eluidos se amplificaron en una cepa E. *coli XL-1 MRF' Blue,* purificada mediante precipitación, y después se usaron para la próxima ronda de selección.

Después de tres rondas de selección, los clones del fago individuales se aislaron y se analizaron mediante secuenciación de ADN y ELISA del fago. Brevemente, la proteína Ang1 se revistió en placas Maxisorp de 96 pozos (Nunc brand, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) y se bloqueó con PBST (PBS con 0.05% Tween-20) que contenía 4% de leches deshidratada. Los sobrenadantes del Fago se incubaron en los pozos y el enlace del fago se detectó con un anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Para verificar la reactividad cruzada a Ang2 o estreptavidina, las placas de control se implantaron de forma similar. Los resultados de ELISA y los datos de secuenciación del ADN se usaron como el criterio

para seleccionar las secuencias del péptido para expresar en un formato del pepticuerpo. Se evaluaron pepticuerpos en un ensayo de HTRF, y algunos se eligieron para una maduración de afinidad.

La maduración de afinidad del péptido se realizó generando y haciendo la inmunoadsorción de las colecciones de expresión del fago dopadas con los nucleótidos. Se obtuvieron colecciones con sobre transformantes de 1 x 10^9. Estas colecciones enfocadas se inmunoadsorbieron mediante un procedimiento similar al usado para inmunoadsorber las colecciones primarias.

Expresión y purificación del Pepticuerpo. El Pepticuerpo mL4-3 se expresó y purificó como se describió en Oliner, J., et al. 2004., *Cancer Cell 6:507-516.* La secuencia del aminoácido de mL4-3 es como sigue, dónde Fc en cursivas denota la secuencia de Fc IgG1 humano como se describió previamente en Oliner, J., J., et al.2004., *Cancer Cell 6:507-516:*

MREWTEEMQVIFDAMMFGPRNDRGGSGSATGSGSTASSGSGSATHREWTEEMQVIFDAMMF GPRNDRGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 47)

La secuencia del aminoácido de la porción de Fc del pepticuerpo mL4-3 es como sigue (del término amino al término carboxilo):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO: 48)

Ensayo HTRF de Neutralización de Angiopoietina:Tie2. La **e**streptavidina etiquetada con Europio (reactivo de LANCE, PerkinElmer Inc. Boston, MA) y Ang1 humano biotinilado (Sistemas R&D, Inc.) o Ang2 se mezcló en una solución amortiguadora HTRF (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA) y se incubó a la temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos en un agitador. Los volúmenes iguales de la mezcla anterior y pepticuerpos consecutivamente diluidos o Fc se mezclaron y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Los volúmenes iguales de Tie2-Fc conjugados con aloficocianina (Tie2-APC) (Prozyme, San Leandro, CA) y la mezcla anterior se mezclaron y se incubaron durante 2 horas a la temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los reactivos en el ensayo fueron europium-estreptavidina 4 nM, Ang1 o Ang2 2 biotinilados 2 nM, y Tie2-APC 5 nM. Los pepticuerpos se diluyeron consecutivamente desde 10,000 nM a 0.5 nM o 100 nM a 0.005 nM para generar las curvas de titulación completas. La neutralización de angiopoietina:interacción de Tie2 se midió disminuyendo la energía de transferencia entre APC y europio

y se cuantificó usando un lector de placa Rubystar (BMG Labtechnologies, Offenberg, Alemania). La potencia de angiopoietina/neutralización del Tie se determinó calculando el porcentaje de inhibición de cada dilución del pepticuerpo con respecto al máximo (ninguna angiopoietina en la mezcla del ensayo) y controles de inhibición mínima (ningún pepticuerpo en la mezcla del ensayo). Los valores de IC_{50} se calcularon graficando el porcentaje de inhibición usando XLfit4, dónde se ajusta =A+((B-A)/(1+((C/X)^D))) (IDBS, Guildford, Reino Unido).

ELISA por Neutralización Angiopoietina:Tie2. Se revistieron las placas de microtitulación de noventa y seis pozos con un panel de angiopoietinas recombinantes en el medio condicionado con 293T células (DMEM/50ug/ml BSA) a 37°C durante 1 hora. Los medios condicionados se usaron en concentraciones de angiopoietina que confirieron 70% de enlace máximo realizable para hTie2-Fc 1 nM (hTie2-Fc Recombinante, Catálogo #313-TI, R&D Sistemas Inc.). Las placas se lavaron tres veces con PBS/0.1% Tween-20 y entonces se bloquearon durante 2 horas a la temperatura ambiente con PBS/5% BSA. La solución de bloqueo se removió sin lavar las placas. ML4-3 o Fc se diluyeron consecutivamente en una solución de Tie2-Fc/1% BSA/PBS 1 nM y se agregaron a las placas revestidas de angiopoietina que se incubaron toda la

noche a la temperatura ambiente y después se lavaron con PBS/1% Tween-20. Un anticuerpo anti-Tie2 derivado de ratón (Catálogo #557039, BD Pharmingen Inc., San José, CA) se agregó bien a cada uno de los pozos a una concentración final de 1 ug/ml y se incubó durante 1 hora a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron después 3 veces con PBS/0.1% Tween-20. El IgG-HRP anti-ratón de cabra (anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de raíz de rábano, Catálogo #31432, Pierce, Rockford, IL) se agregó a una dilución de 1:10,000 en PBS/1% BSA en cada uno de los pozos y las placas se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS/0.1% Tween-20 antes de agregar el substrato TMB (Reserva SureBlue TMB, Catalogo #53-00002, KPL, Gaithersburg, Maryland) y la densidad óptica a 650 nM se midió en un lector de placa (SpectraMax, Dispositivos Moleculares, Sunnyvale, CA). El grado de angiopoietina:neutralización de Tie2 (IC_{50}) se determinó mediante la comparación contra una curva estándar Tie2 (actividad de enlace de Tie2 consecutivamente diluida en ausencia del competidor) usando XLfit.

Estudios animales. Todos los procedimientos fueron aceptados por el Comité de Uso y Cuidado Animal Amgen y la Asociación para la Valoración y Acreditamiento de los Estándares de Cuidado en Animales de Laboratorio.

Valoración farmacocinética. Tres ratones CD-1 recibieron una inyección s.c. simple de 3.2 mg/kg de mL4-3, y dos ratas de Sprague-Dawley recibieron una sola inyección i.v. de 10 mg/kg de mL4-3. Las muestras sanguíneas se recolectaron hasta 274 horas de los ratones y 336 horas de las ratas para la valoración farmacocinética de suero. Las concentraciones de mL4-3 en muestras de suero de cada especie se midieron mediante un ensayo inmunoabsorbente enlazado con la enzima (ELISA). Las placas de 96 pozos de poliestireno se revistieron con Ang1 humano, seguido por la incubación con muestras de suero que contenían mL4-3. Después de enjuagar cualquier substancia no enlazado, un anticuerpo anti-IgG1 de ratón monoclonal etiquetado con peroxidasa de raíz de rábano se agregó a los pozos. Siguiendo una etapa del lavado para remover cualquier anticuerpo de monoclonal no enlazado, el substrato de TMB-peroxidasa se agregó a los pozos. Las unidades de densidad óptica medidas a 450-650 nm se convirtieron a concentraciones mediante la comparación de una curva estándar analizada concurrentemente.

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante el análisis no compartamental de los datos de concentración de suero individuales-tiempo (WinNonlin Profesional, versión 3.3; Pharsight Corp, Mountain View, CA). La vida media de la fase terminal ($t_{1/2}$) se calculó como el $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda z$, en la

que λz es la constante de proporción de eliminación de la fase terminal de primer orden estimada vía la regresión lineal de la fase de decaimiento log-lineal terminal. El área bajo la curva de concentración de suero-tiempo ($AUC_{0\text{-último}}$) se estimó mediante el método trapezoidal lineal/log de tiempo 0 al tiempo de la última concentración cuantificable ($C_{\text{última}}$). $AUC_{0\text{-inf}}$ se estimó desde el tiempo 0 a la infinidad como $AUC_{0\text{-inf}} = AUC_{0\text{-último}} + C_{\text{último}}/\lambda z$. Los valores de $AUC_{0\text{-inf}}$ se normalizaron a una dosis de 1 mg/kg.

Debido a que las propiedades farmacocinéticas de mL4-3, L1-7, y AMG 386 fueron disímiles, los niveles y esquemas de la dosis de cada agente se eligieron, donde fue posible para lograr las concentraciones de estado estacionario C_{min} de suero equimolar dentro de los estudios de la farmacología.

Administración de mL4-3 a ratones preñados. Dos grupos de seis ratones hembras 129/SV fueron preñados por machos C57BL/6. Las hembras preñadas fueron dosificadas con 300 mg/kg Fc control o mL4-3 mediante la administración s.c. en días gestacionales E4.5, E7.5 y E11.5. Los conceptus (embriones y placentas) se removieron en el día E12.5, evaluado para las anormalidades gruesas, y se fijaron mediante la inmersión en IHC-cinc (mL4-3-tratado, n = 10; Fc control-tratado, n = 10) o solución de Bouin (mL4-3-tratado, n = 5; Fc control-tratado, n = 6). Los tejidos incrustados de

parafina se seccionaron en una etapa a intervalos de 50 µm a través del corazón (embriones en orientación longitudinal y orientación transversal) y la mitad de la placenta. Las secciones seriales de cada intervalo se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o se tiñeron con un procedimiento de inmunohistoquímica indirecto convencional usando anti-CD31 policlonal (monoclonal anti-ratón de rata MEC 13.3, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) para etiquetar específicamente los vasos sanguíneos. El criterio para registrar los cambios se estableció evaluando las secciones con un conocimiento previo del tratamiento. Como consecuencia, la severidad de la lesión se graduó rápidamente usando una escala en etapas (mínimo, apacible, moderado, o marcado) y un paradigma analítico ciego. Estos datos de la patología ordinales se analizaron usando la prueba Chi-cuadrada contenida en el paquete del software estadístico JMP (v.5.1; Instituto SAS Inc., Cary, NC). Un embrión de cada madre preñada coleccionado en el día E12.5 se analizó por ELISA usando Ang1 humano como un reactivo de captura y el anticuerpo anti-IgG1 de ratón monoclonal etiquetado con peroxidasa de raíz de rábano como un reactivo de detección.

Ensayo de fosforilación Tie2. El efecto de los inhibidores de angiopoietina selectivos en la fosforilación de Tie2 Ang1-inducida en los pulmones de ratón se realizó como se describe

en Hodous, B.L., et al, 2007., J. Med. Chem 50:611-626). Brevemente, los ratones sin pelo CD-1 (Charles River Laboratorios, Wilmington, MA) se trataron s.c. una vez diariamente para 23 días con Fc control (20 mg/kg), mL4-3 (20 mg/kg) o L1-7(N) (2 mg/kg). Los ratones (n = 3 por grupo) se administraron entonces 12 µg después de una inyección i.v. de Ang1 recombinante (R&D Systems Inc.). Quince minutos después, se cosecharon los pulmones del ratón, y los niveles de Tie2 fosforilados se determinaron por el análisis de immunoprecipitación-Western blot. El análisis estadístico se realizó usando un análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba post hoc de Fisher usando el software StatView 5.0.1 (SAS Institute Inc.). Los resultados se expresan como la media ± error estándar (SE).

Modelos de tumor de xenoinjerto. Se usaron ratones hembra sin pelo de ocho a 10 semanas de edad CD1 (Charles River Laboratorios) en todos los experimentos. Los ratones se inyectaron s.c. con 2 x 10^6 células Colo205 en un tercio volumen Matrigel (BD Biosciences, San José, CA). Los pepticuerpos o control Fc se administraron mediante una inyección s.c. una vez que se establecieron los tumores. AMG 386 se dosificó dos veces por semana; los otros pepticuerpos y el Fc control se dosificó una vez diariamente. Cuando fue necesario, la proteína Fc control se agregó a los grupos de tratamiento para hacer coincidir la cantidad total de la

proteína suministrada en el grupo de combinación (5.2 mg/kg). Las medidas del tumor y pesos corporales se registraron dos veces por semana. Todos los estudios del tumor se realizaron en forma ciega. El volumen del tumor se calculó como la longitud x la anchura x la altura en mm^3. Los resultados se expresan como ± SE media. El análisis estadístico se realizó usando el análisis de las medidas repetidas de varianza seguido por la prueba post hoc de Scheffé usando el software StatView 5.0.1 (Instituto SAS Inc.).

Ensayo de la proliferación celular endotelial del tumor. **L**a proliferación celular endotelial del tumor se ensayó como se describe previamente (Oliner, J., J., et al.2004., *Cáncer Célula 6:507-516).* Brevemente, los ratones que tienen el tumor Colo205 se trataron sistémicamente con los pepticuerpos durante 72 horas e implantaron con bombas osmóticas que contienen 3 mg/mL BrdU 16 horas previas a la eutanasia. Los tumores se cosecharon, disociaron, fijaron y tiñeron para permitir la determinación de la incorporación de BrdU en las células endoteliales del tumor. El análisis estadístico se realizó usando una prueba T que usó un t-prueba impar.

Modelo de la angiogénesis corneal. **L**os estudios de la angiogénesis inducida por VEGF y bFGF se realizaron en las ratas CD hembras (n = 8 por grupo) como se describe en Coxon, A., J., et al.*Artritis Rheum 46:2604-2612, 2002.* Inhibición

de interleuquina-1 pero no el factor de necrosis de tumor suprime la neovascularización en modelos de rata de angiogénesis corneal y artritis adjuvante. El tratamiento con Fc (60 mg/kg), L1-7(N) (5 mg/kg), mL4-3 (60 mg/kg), o la combinación de L1-7(N) y mL4-3 (en las mismas dosis usadas en los grupos de agente simple) se inició en el día previo a la cirugía y se continuó en el día 3 y el día 6. En el día 8 el estudio se terminó y las córneas fueron fotografiadas, como se describió en (Oliner, J., J., et al.2004., *Cancer Cell* 6:507-516).

Para cada imagen corneal, se contó el número de vasos sanguíneos que intersectan el punto medio entre el disco implantado y el limbus. Todas las evaluaciones se realizaron en una forma ciega. La importancia estadística se evaluó por ANOVA seguido por la prueba post hoc de Fisher.

Neovascularización retinal. La retinopatía isquémica se produjo en ratones C57BL/6J usando el método descrito por Smith et al., *Invest. Ophthalmol Vis Sci 35: 101-111, 1994.* El día siete postnatal (P7) las crías y sus madres se colocaron en una cámara hiperoxica (75 ± 0.5% de oxígeno) durante 5 días y después se regresaron al aire ambiental durante 5 días adicionales (n = 7 crías por grupo). La temperatura de la cámara se mantuvo entre 20°C y 22°C, y el oxígeno se controló constantemente mediante una unidad de

control de oxígeno (Modelo ProOx P110 acoplado al Modelo de sensor de oxígeno E702 Biospherix S.A., Redfield, NY). Una jaula con crías P7 permanecieron en el aire del ambiente (condición normoxia). El control Fc (200 mg/kg), mL4-3 (100 mg/kg), L1-7(N) (100 mg/kg), o la combinación de mL4-3/L1-7(N) (100 mg/kg cada uno) se administró s.c. una vez diariamente durante nueve días que inician en P8. Desde P8 a P11 las inyecciones se administraron usando los puertos para ganar acceso en la cámara. En P17 las crías se sacrificaron y sus ojos se removieron y fijaron usando el fijador de Davidson. Los ojos se procesaron después en parafina usando los métodos estándares. Las secciones de la etapa se cortaron paralelas al eje óptico en intervalos de 100-µm. Los bloques se seccionaron completamente, produciendo 15 o 16 secciones por ojo. Todas las secciones se tiñeron con H&E. De los 15 o 16 portaobjetos en las series de etapa-sección, la mitad de los 10 portaobjetos consecutivos se usaron en los análisis, agrupando cada lado del eje óptico. Para cada sección, se contó el número de núcleos vasculares (ambos endotelial y núcleos pericito) que estaban en el lado vítreo de la membrana limitante interna. El conteo de los portaobjetos individuales se registró y todo el conteo de las diez secciones se sumó para cada animal. Se contaron cinco ratones en cada grupo de estudio. Todos los conteos se realizaron en una forma ciega, sin el conocimiento de condiciones del

tratamiento. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido por la prueba post hoc de Fisher.

Angiogénesis folicular ovárica. La superovulación se indujo en ratones del estudio usando la metodología normal. Brevemente, los ratones de cuatro semanas de edad hembras C57BL/6J se inyectaron con 5-7 IU PMS, restableciendo eficazmente el ciclo del estrus. Cuarenta y ocho horas después, los ratones se inyectaron con 5 IU de HCG para inducir la superovulación. Las hembras fueron inseminadas artificialmente y permanecieron en el estudio durante 24 horas. Los ratones del estudio se trataron dos veces con los pepticuerpos por día. La dosificación comenzó en el momento de la inyección PMS inicial y continuo durante dos días consecutivos, con la cuarta dosis dada concurrentemente con la inyección de HCG. Los ratones se eutanizaron 48 horas después de la inyección de HCG. Los ovarios derechos e izquierdos se removieron y se fijaron mediante inmersión en la solución Tris de cinc fría. Después de 48 horas, los ovarios se transfirieron a 70% etanol y se procesaron mediante parafina usando los métodos estándar. Dos secciones secuenciales se cortaron desde cada par del ovario y se tiñeron individualmente ya sea con H&E o inmunotiñeron para el endotelio vascular (CD31, monoclonal de anti-ratón de rata MEC 13.3, BD Biosciences Pharmingen) usando DAB como el

cromogen. Adicionalmente, las secciones anti-CD31 de IHC se contratiñeron ligeramente con hematoxilina. Los folículos individuales seleccionados para el análisis, se identificaron en base al estado transformacional. Esto se determinó mediante la inspección del tratamiento ciego de las secciones H&E bajo resistencia baja. Las imágenes correspondientes de diez folículos transformados por el animal, dónde fueron factibles, se capturaron entonces a 10 x amplificación objetiva de las secciones inmunoteñidas de anti-CD31. El área de la sección del folículo se delineó como un ROI, y la fracción del área CD31-positiva se determinó vía la umbralización RGB usando el software de análisis de imagen MetaMorph (MetaMorph v6.1, UIC, Downingtown, PA). El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido por la prueba post hoc de Dunnett.

Evaluación de tejidos normales en ratas tratadas. Los pepticuerpos se evaluaron en las ratas de Sprague-Dawley (Charles River Laboratories) para los efectos en tejidos normales. Los animales recibieron 300 mg/kg de AMG 386, L1-7(N) o mL4-3 IV dos veces por semana durante 28 días (n = 10 animales por grupo). En la necropsia esquematizada, un conjunto del tejido completo se seccionó, se tiño y se observó para los cambios microscópicos.

Tabla 10

Pepticuerpos inhiben competitivamente las interacciones de angiopoietina:Tie2

	hAng1	**hAng2**
Agente	**IC50 (nM)**	**IC50 (nM)**
L1-7(N)	> 10,000	0.064
el mL4-3	0.022	3085
AMG 386	6.2	0.029
Fc	> 10,000	> 10,000

H, humano.

Tabla 11

mL4-3 neutraliza selectivamente a Ang1:interacciones Tie2.

	hAng1	**mAng1**	**rAng1**	**cAng1**	**hAng2**	**mAng2**	**cAng2**
	IC_{50}	**IC_{50}**	**IC_{50}**	**IC_{50}**	**IC_{50}**	**IC_{50}**	**IC_{50}**
Agente	**(nM)**	**(nM)**	**(nM)**	**(nM)**	**(nM)**	**(nM)**	**(nM)**
mL4-3	0.045	0.033	0.061	0.039	1876	> 10,000	1890
	>	>	>	>	>	>	>
Fc	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000

H, humano; m, ratón; r, conejo; c, mono cynomolgus,

Tabla 12

Media de los Parámetros farmacocinéticos de inhibidores de angiopoietina en ratones y ratas

	Ratón		Rata	
	Dosis-AUC_0 normalizada		Dosis-AUC_0 normalizada	
	$T_{1/2}$	inf	$T_{1/2}$	inf
Agente	**(hr)**	**(μM·hr/mg/kg)**	**(hr)**	**(μM·hr/mg/kg)**
mL4-3	45	5.0	42	3.6
L1-7(N)[a]	56	7.0	47	4.6
AMG 386[a]	97	15	85	8.7

[a]Adaptada desde Oliner et al (18)

Tabla 13

Inhibición selectiva de Ang1 o Ang2 induce la atrofia ovárica, pero no el espesamiento de la placa epifiseal.

Engrosamiento de la placa epifiseal		Engrosamiento de la placa epifiseal	
Agente	**(machos)**	**(hembras)**	**Atrofia ovárica**
AMG 386	10	10	8
L1-7(N)	0	0	8
mL4-3	0	0	6

N = 10 por grupo.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 7; caracterizado porque el anticuerpo enlaza específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

2. Un anticuerpo aislado que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17; caracterizado porque el anticuerpo enlaza específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

3. Un anticuerpo aislado que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende 3 CDRs y la cadena ligera está comprendida de 3 CDRs, caracterizado porque las secuencias de las CDRs del anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de:

(a) SEQ ID NOs: 18, 26, 32 del HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 del LC,

(b) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 del HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 del LC,

(c) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 del HC más SEQ ID NOs: 20, 27, 36 del LC,

(d) SEQ ID NOs: 18, 26, 37 del HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 del LC,

(e) SEQ ID NOs: 18, 26, 38 del HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 del LC,

(f) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 del HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 del LC,

(g) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 del HC más SEQ ID NOs: 21, 27, 33 del LC,

(h) SEQ ID NOs: 18, 28, 39 del HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 del LC,

(i) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 del HC más SEQ ID NOs: 22, 27, 33 del LC,

(j) SEQ ID NOs: 18, 26, 32 del HC más SEQ ID NOs: 22, 27, 33 del LC,

(k) SEQ ID NOs: 18, 29, 39 del HC más SEQ ID NOs: 19, 27, 33 del LC,

(l) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 del HC más SEQ ID NOs: 23, 27, 33 del LC,

(m) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 del HC más SEQ ID NOs: 20, 27, 40 del LC,

(n) SEQ ID NOs: 18, 26, 32 del HC más SEQ ID NOs: 21, 27, 33 del LC,

(o) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 del HC más SEQ ID NOs: 24, 27, 33 del LC,

(p) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 del HC más SEQ ID NOs: 21, 27, 33 del LC,

(q) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 del HC más SEQ ID NOs: 23, 27, 33 del LC,

(r) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 del HC más SEQ ID NOs: 20, 30, 33 del LC,

(s) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 del HC más SEQ ID NOs: 25, 27, 33 del LC,

(t) SEQ ID NOs: 18, 26, 35 del HC más SEQ ID NOs: 20, 30, 33 del LC,

(u) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 del HC más SEQ ID NOs: 20, 27, 40 del LC, y

(v) SEQ ID NOs: 18, 26, 34 del HC más SEQ ID NOs: 20, 31, 33 del LC;

en donde el anticuerpo enlaza específicamente a al menos uno de los ligandos Ang1 y Ang2 del receptor Tie 2.

4. El anticuerpo aislado de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de: H6L7, H5L7, H4L13, H11L7, H10L7, H4L7, H5L6, H2L7, H5L8, H6L8, H3L7, H5L4, H4L12, H6L6, H4L2, H4L6, H4L4, H5L11, H5L1, H4L11, H5L12, y H5L9.

5. El anticuerpo aislado de conformidad con la reivindicación 4 caracterizado porque es un anticuerpo completamente humano.

6. Un fragmento de anticuerpo del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque comprende una región CDR con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, y SEQ ID NO: 40.

7. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo de las reivindicaciones 1 ó 6.

8. Un vector que contiene una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7.

9. Una célula hospedera que contiene el vector de la reivindicación 8.

10. La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 9 que es una célula de CHO.

11. Un método para la elaboración del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 4 l cual comprende expresar el anticuerpo en la célula hospedera.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11 caracterizado porque la célula hospedera es una célula de CHO.

13. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende cualesquiera de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en H6L7, H5L7, H4L13, H11L7, H10L7, H4L7, H5L6, H2L7, H5L8, H6L8, H3L7, H5L4, H4L12, H6L6, H4L2, H4L6, H4L4, H5L11, H5L1, H4L11, H5L12, y H5L9;
en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable para ello.

14. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque comprende además una molécula seleccionada del grupo que consiste en una molécula reportera, un polímero soluble en agua, una región Fc de anticuerpos, y un agente citotóxico.

15. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque dicho portador farmacéuticamente aceptable es un agente de formulación farmacéutica.

16. Un método para la inhibición de angiogénesis indeseable que comprende administrar a un sujeto que necesita del mismo, una cantidad efectiva de cualesquiera de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste de H6L7, H5L7, H4L13, H11L7, H10L7, H4L7, H5L6, H2L7, H5L8, H6L8, H3L7, H5L4, H4L12, H6L6, H4L2, H4L6, H4L4, H5L11, H5L1, H4L11, H5L12, y H5L9.

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la angiogénesis indeseable es cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.
Boone, Thomas C.
Oliner, Jonathan D.

<120> ANTICUERPOS DIRIGIDOS A ANGIOPOIETINA-1 Y ANGIOPOIETINA-2 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> A-1382-WO-PCT

<140> -a asignarse -
<141> 2009-02-20

<150> US 61/139,361
<151> 2008-12-19

<150> US 61/061,943
<151> 2008-06-16

<150> US 61/066,632
<151> 2008-02-20

<160> 48

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 122
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

240

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

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

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

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

<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

Gly

<210> 27

<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

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

Gly

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Gly

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Leu Gly Ser Asp Arg Ala Ser
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Ala Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

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

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

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

<210> 36
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Gln Val Thr His Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

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

<210> 38
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

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

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

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

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Gln Ala Thr His Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 41

<211> 981
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(981)

<400> 41

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

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

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

ggc gtg cac acc ttc cca gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc      192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc aac ttc ggc acc cag acc      240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag      288
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

aca gtt gag cgc aaa tgt tgt gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca      336
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

cct gtg gca gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      384
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        115                 120                 125

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac      432
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    130                 135                 140

gtg agc cac gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      480
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145                 150                 155                 160

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac      528
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
                165                 170                 175
```

```
agc acg ttc cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg      576
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
            180                 185                 190

ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca      624
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
        195                 200                 205

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa      672
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    210                 215                 220

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac      720
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225                 230                 235                 240

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc      768
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                245                 250                 255

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc      816
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

aca cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag      864
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        275                 280                 285

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc      912
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    290                 295                 300

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

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

<210> 42
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

252

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 43
<211> 324
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 43
cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 45

```
ggc caa ccg aaa gcg gcg ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct       48
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1               5                   10                  15

gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac       96
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
            20                  25                  30

ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc      144
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
        35                  40                  45

gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac      192
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
    50                  55                  60

aag tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag      240
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65                  70                  75                  80

tcc cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg      288
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
                85                  90                  95

gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag                          321
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
            100                 105
```

<210> 46
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

<210> 47
<211> 72
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

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

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

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

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

Asn Asp Arg Gly Gly Gly Gly Gly
65 70

<210> 48
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

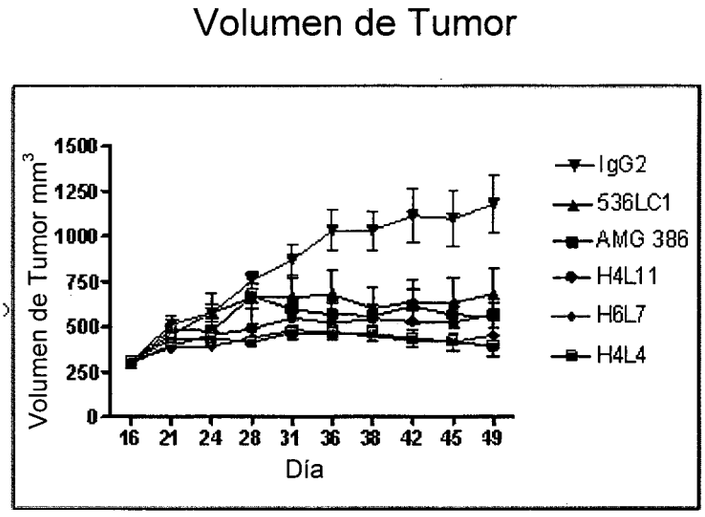
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

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

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

Pro Gly Lys
225

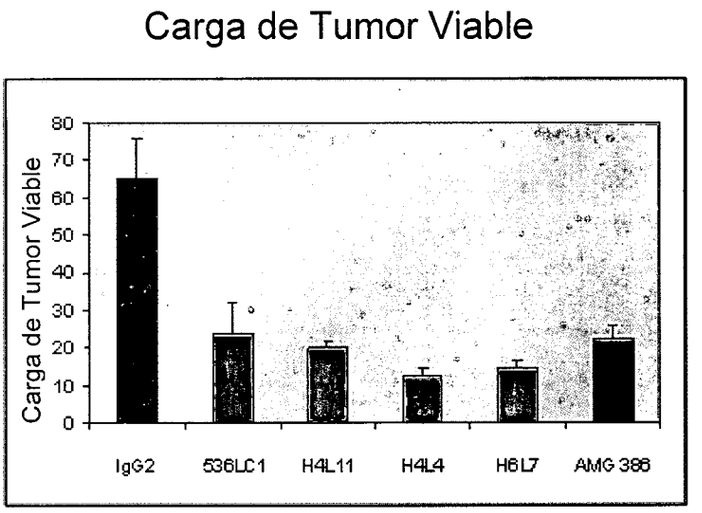
FIGURA 1. Actividad de Anticuerpos de Angiopoietina en Xeno-injertos de Tumor Colo205



p<0.0001 para todos los grupos vs control IgG2
p=0.0008 para 536LC1 vs H6L7
p=0.0009 para 536LC1 vs H4L4

259

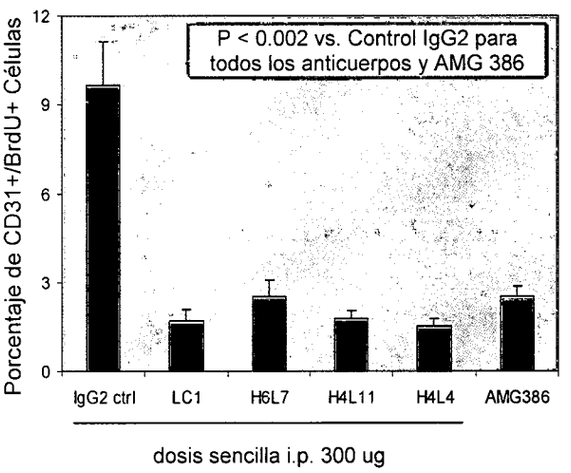
FIGURA 2. Carga de Tumor Viable de Anticuerpos de Angiopoietina en Xenoinjertos de Tumor Colo205



p<0.0001 para todos los grupos vs control IgG2

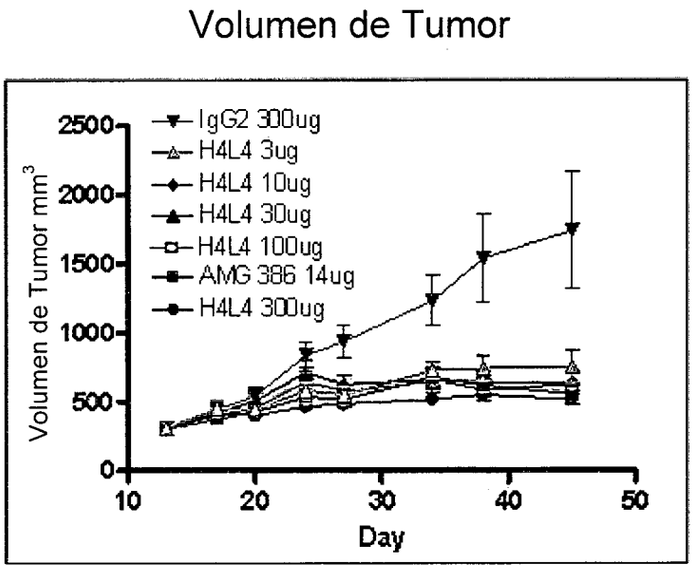
260

FIGURA 3. Efecto de Anticuerpos Anti-Ang-1 y/o Ang-2 en Proliferación celular Endotelial *In Vivo*



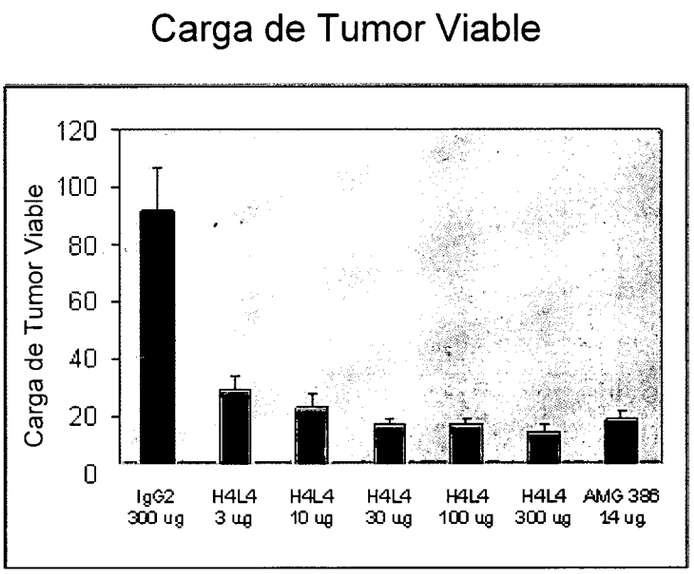
261

FIGURA 4. Dosis Baja de H4L4 Inhibe Crecimiento de Tumor Colo205



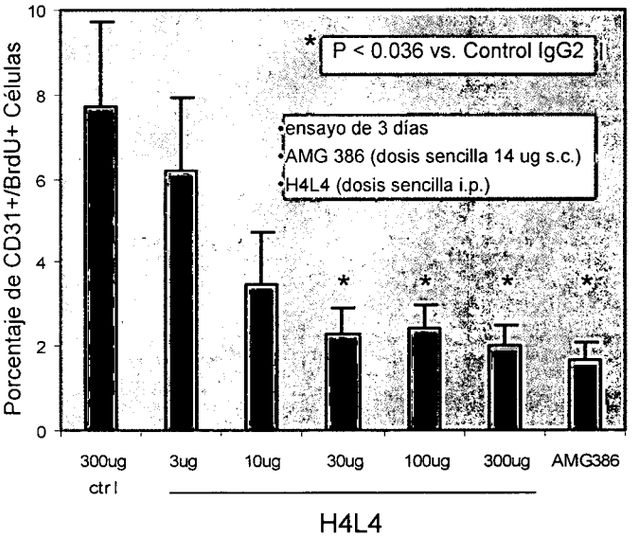
P<0.0001 para todos los grupos vs IgG2

FIGURA 5. Dosis Baja de Anticuerpo H4L4 Reduce Carga Viable de Tumor



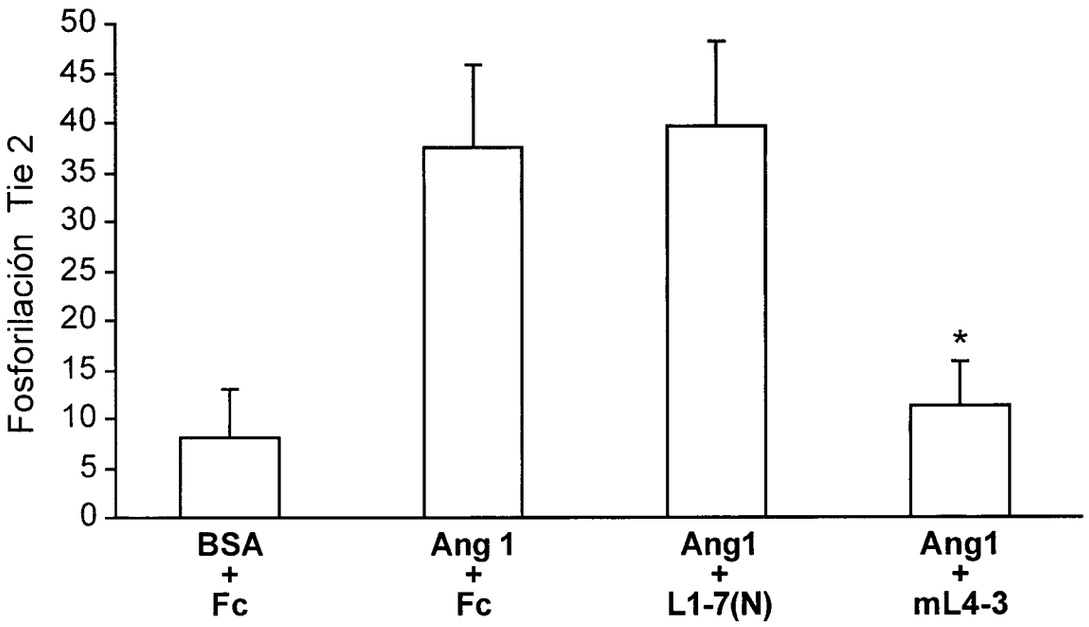
P<0.0001 para todos los grupos vs control IgG2
P=0.028 para 3 ug vs 300 ug H4L4

FIGURA 6. Efecto de H4L4 en Proliferación Celular Endotelial de Tumor Colo205 *In Vivo*



264

Figura 7


Fosforilación Tie 2
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
BSA + Fc
Ang 1 + Fc
Ang1 + L1-7(N)
Ang1 + mL4-3

265

Figura 8

Figura 8A.

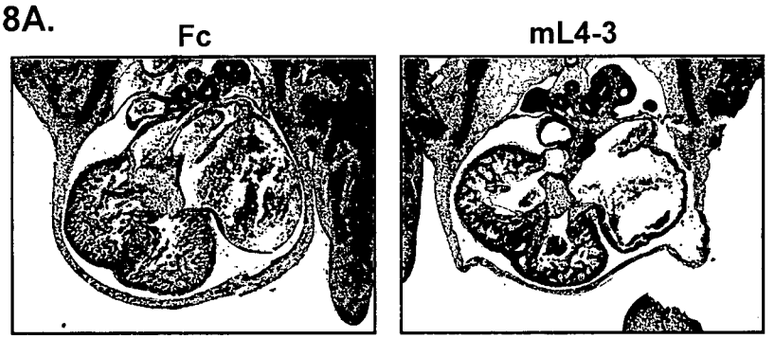
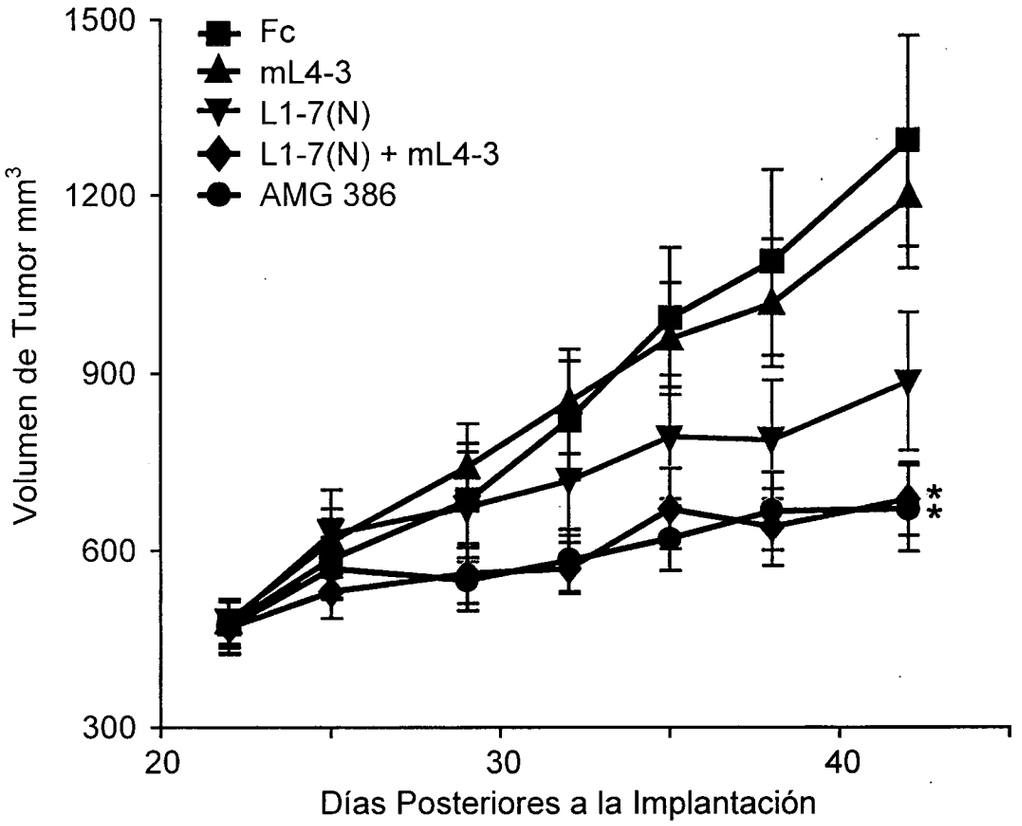


Figura 8B.

Aspecto Cardíaco	Interpretación	Incidencia n (%) Fc	mL4-3
Tamaño normal, muchas trabéculas	Normal	9 (56%)	0
Tamaño normal, levemente menos trabéculas	Normal	6 (38%)	3 (20%)
Tamaño normal, moderadamente menos trabéculas	Normal	0	1 (7%)
Tamaño reducido, muchas menos trabéculas	Anormal	1 (6%)	11 (73%)*
	Total	**16 (100%)**	**15 (100%)**

266

Figura 9


1500
1200
900
600
300
Volumen de Tumor mm3
Fc
mL4-3
L1-7(N)
L1-7(N) + mL4-3
AMG 386
20
30
40
Días Posteriores a la Implantación
**

287

Figura 10

Figura 10A.

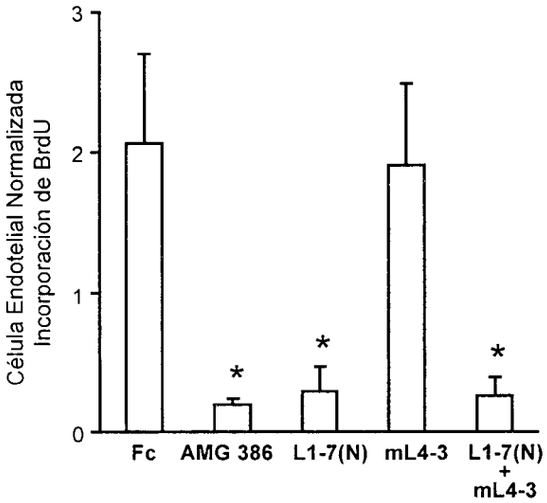


Figura 10B.

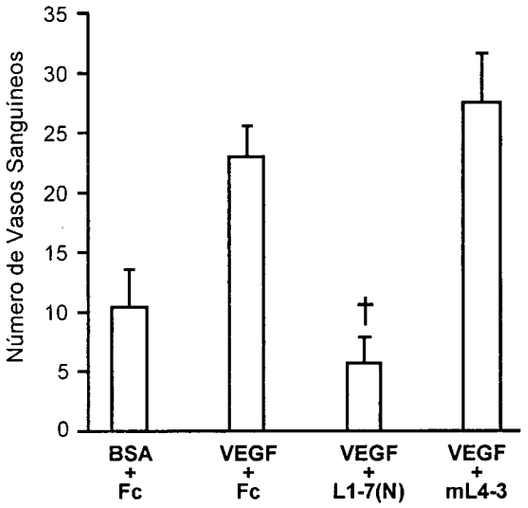


Figura 10C.

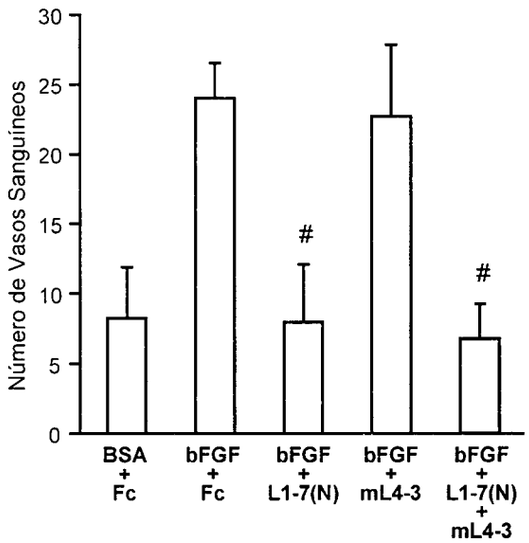
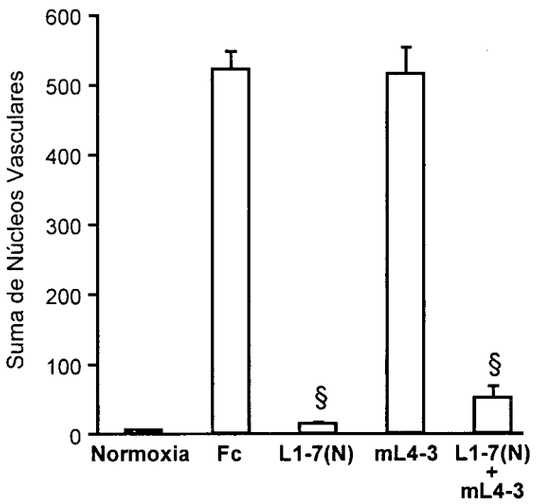
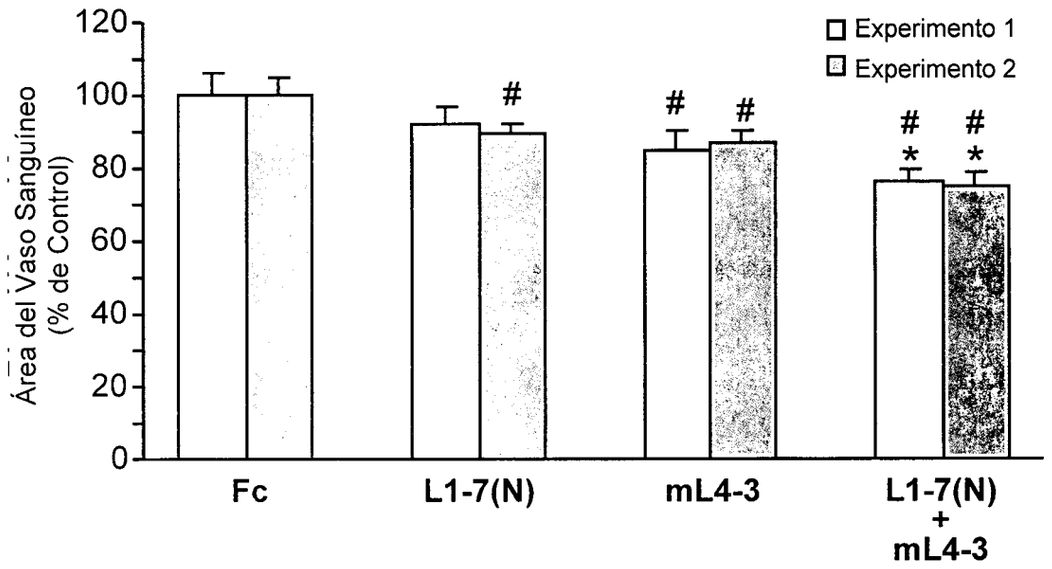


Figura 10D.



268

Figura 11



269

A1382-WO-PCT

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

0	**For receiving Office use only**	
0-1	International Application No.	PCT/US 09/01122
0-2	International Filing Date	20 FEB 2009 (20.02.09)
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	RO/US

0-4	**Form PCT/RO/101 PCT Request**	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.036.211 MT/FOP 20090101/0.20.5.15
0-5	**Petition** The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	**Receiving Office (specified by the applicant)**	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	**Applicant's or agent's file reference**	A1382-WO-PCT
I	**Title of Invention**	ANTIBODIES DIRECTEDTO ANGIOPOIETIN-1 AND ANGIOPOIETIN-2 AND USES THEREOF
II	**Applicant**	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	AMGEN INC.
II-5	Address	One Amgen Center Drive Thousand Oaks, California 91320 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	206-265-7000
II-9	Facsimile No.	206-233-0644

A1382-WO-PCT

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

III-1	**Applicant and/or inventor**	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	BOONE, Thomas C.
III-1-5	Address	2715 Kelly Knoll Lane Newbury Park, California 91320 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US
III-2	**Applicant and/or inventor**	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	OLINER, Jonathan D.
III-2-5	Address	959 Golden Crest Avenue Newbury Park, California 91320 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
IV-1	**Agent or common representative; or address for correspondence** The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	RAN, David B.
IV-1-2	Address	Amgen Inc. Law Department 1201 Amgen Court West Seattle, Washington 98119 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	206-265-7309
IV-1-4	Facsimile No.	206-233-0644
IV-1-5	e-mail	dran@amgen.com
IV-1-5(a)	E-mail authorization The receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority are authorized to use this e-mail address to send, if the Office or Authority so wishes, advance copies of notifications in respect of this international application.	Yes

V	DESIGNATIONS	
V-1	**The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.**	
VI-1	**Priority claim of earlier national application**	
VI-1-1	Filing date	20 February 2008 (20.02.2008)
VI-1-2	Number	61/066,632
VI-1-3	Country	US
VI-2	**Priority claim of earlier national application**	
VI-2-1	Filing date	16 June 2008 (16.06.2008)
VI-2-2	Number	61/061,943
VI-2-3	Country	US
VI-3	**Priority claim of earlier national application**	
VI-3-1	Filing date	19 December 2008 (19.12.2008)
VI-3-2	Number	61/139,361
VI-3-3	Country	US
VI-4	**Priority document request** The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2, VI-3
VI-5	**Incorporation by reference :** where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.	
VII-1	**International Searching Authority Chosen**	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	3	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

A1382-WO-PCT

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	9	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	106	-
IX-3	Claims	3	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	11	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	130	
IX-6a	Sequence listing part of description	20	-
IX-7	TOTAL	150	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	✓	-
IX-16(A)	Sequence listing in electronic form		
IX-16(A)-(ii)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-18	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	other	Sequence Statement	
IX-19	other	PTO-1382 Transmittal	
IX-19	other	Postcard	
IX-20	**Figure of the drawings which should accompany the abstract**		
IX-21	**Language of filing of the international application**	English	
X-1	**Signature of applicant, agent or common representative**	David B. Ran	
X-1-1	Name (LAST, First)	RAN, David B.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		20-02-2009

A1382-WO-PCT

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	**Date of actual receipt of the purported international application**	IAP19 Rec'd PCT/PTO 20 FEB 2009
10-2	**Drawings:**	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	**Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application**	
10-4	**Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)**	
10-5	**International Searching Authority**	ISA/EP
10-6	**Transmittal of search copy delayed until search fee is paid**	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	**Date of receipt of the record copy by the International Bureau**	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
27 August 2009 (27.08.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/105269 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/22 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/001122

(22) International Filing Date:
20 February 2009 (20.02.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/066,632	20 February 2008 (20.02.2008)	US
61/061,943	16 June 2008 (16.06.2008)	US
61/139,361	19 December 2008 (19.12.2008)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **AMGEN INC.** [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **BOONE, Thomas, C.** [US/US]; 2715 Kelly Knoll Lane, Newbury Park, California 91320 (US). **OLINER, Jonathan, D.** [US/US]; 959 Golden Crest Avenue, Newbury Park, California 91320 (US).

(74) Agent: **PENN, Michael, G.**; Amgen Inc., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: ANTIBODIES DIRECTED TO ANGIOPOIETIN-1 AND ANGIOPOIETIN-2 AND USE THEREOF

(57) Abstract: Disclosed are specific binding agents, such as fully human antibodies, that bind to angiopoietin 1 and/or angiopoietin-2. Also disclosed are heavy chain fragments, light chain fragments, and CDRs of the antibodies, as well as methods of making and using the antibodies.

WO 2009/105269 A1

276

VIII-2-1	**Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application AMGEN INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(iv)		an assignment from BOONE, Thomas C. to AMGEN INC., dated 09 January 2009 (09.01.2009)
VIII-2-1(iv)		an assignment from OLINER, Jonathan D. to AMGEN INC., dated 09 January 2009 (09.01.2009)

VIII-2-2	**Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application AMGEN INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(iv)		an assignment from BOONE, Thomas C. to AMGEN INC., dated 07 August 2008 (07.08.2008)
VIII-2-2(iv)		an assignment from OLINER, Jonathan D. to AMGEN INC., dated 07 August 2008 (07.08.2008)

VIII-2-3	**Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application AMGEN INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-3(iv)		an assignment from BOONE, Thomas C. to AMGEN INC., dated 07 August 2008 (07.08.2008)
VIII-2-3(iv)		an assignment from OLINER, Jonathan D. to AMGEN INC., dated 07 August 2008 (07.08.2008)

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 07 March 2009 (07.03.2009)

Information valid as of: 26 March 2010 (26.03.2010)
Report generated on: 10.08.2010

(10) Publication number:	**(43) Publication date:**	**(26) Publication language:**
WO2009/105269	27 August 2009 (27.08.2009)	English (EN)
(21) Application Number:	**(22) Filing Date:**	**(25) Filing language:**
PCT/US2009/001122	20 February 2009 (20.02.2009)	English (EN)
(31) Priority number(s):	**(31) Priority date(s):**	**(31) Priority status:**
61/066,632 (US)	20 February 2008 (20.02.2008)	
61/061,943 (US)	16 June 2008 (16.06.2008)	Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)
61/139,361 (US)	19 December 2008 (19.12.2008)	Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:
C07K 16/22 (2006.01); **A61K 39/395** (2006.01); **A61P 35/00** (2006.01); C07K 19/00 (2006.01); C07K 14/00 (2006.01)

(71) Applicant(s):
AMGEN INC. [US/US]; One Amgen Center Drive Thousand Oaks, California 91320 (US) *(for all designated states except US)*
BOONE, Thomas, C. [US/US]; 2715 Kelly Knoll Lane Newbury Park, California 91320 (US) *(for US only)*
OLINER, Jonathan, D. [US/US]; 959 Golden Crest Avenue Newbury Park, California 91320 (US) *(for US only)*

(72) Inventor(s):
BOONE, Thomas, C.; 2715 Kelly Knoll Lane Newbury Park, California 91320 (US)
OLINER, Jonathan, D.; 959 Golden Crest Avenue Newbury Park, California 91320 (US)

(74) Agent(s):
PENN, Michael, G.; Amgen Inc. One Amgen Center Drive Thousand Oaks, CA 91320 (US)

(54) Title (EN): ANTIBODIES DIRECTED TO ANGIOPOIETIN-1 AND ANGIOPOIETIN-2 AND USE THEREOF

(54) Title (FR): ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE L'ANGIOPOÏÉTINE 1 ET L'ANGIOPOÏÉTINE 2 ET LEUR UTILISATION

(57) Abstract:

(EN): Disclosed are specific binding agents, such as fully human antibodies, that bind to angiopoietin 1 and/or angiopoietin-2. Also disclosed are heavy chain fragments, light chain fragments, and CDRs of the antibodies, as well as methods of making and using the antibodies.

(FR): La présente invention concerne des agents de liaison spécifiques, tels que des anticorps pleinement humains, qui se lient à l'angiopoïétine 1 et/ou à l'angiopoïétine 2. L'invention concerne également des fragments de chaînes lourdes, des fragments de chaînes légères et des régions déterminant la complémentarité (CDR) des anticorps, ainsi que des procédés de fabrication et d'utilisation desdits anticorps.

International search report:
Received at International Bureau: 17 June 2009 (17.06.2009) [EP]

International preliminary examination report:
Not available

280

(81) Designated States:

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW
European Patent Office (EPO) : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR
African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

Declarations:

Declaration made as applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/001122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/22 A61K39/395 A61P35/00
ADD. C07K19/00 C07K14/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/045049 A (AMGEN INC [US]; OLINER JONATHON DANIEL [US]; GRAHAM KEVIN [US]) 27 April 2006 (2006-04-27) figure 1; examples 4,5; tables 2-4,7-11; sequences 11, 12	1-17
X	WO 2006/068953 A (ABGENIX INC [US]; ASTRAZENECA AB [SE]; GREEN LARRY L [US]; ZHOU QING [] 29 June 2006 (2006-06-29) examples 1-4,8-13,17,19-23; tables 8,10	1-17
X	WO 2006/069202 A (AMGEN INC [US]; CALZONE FRANK J [US]; DESHPANDE RAJENDRA V [US]; TSAI) 29 June 2006 (2006-06-29) figure 4	6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 June 2009	17/06/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Luyten, Kattie

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/001122

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006045049 A	27-04-2006	AU 2005295260 A1	27-04-2006
		CA 2583910 A1	27-04-2006
		EP 1805219 A1	11-07-2007
		KR 20070085408 A	27-08-2007
WO 2006068953 A	29-06-2006	AR 052065 A1	28-02-2007
		AU 2005319382 A1	29-06-2006
		BR PI0519596 A2	24-03-2009
		CA 2595610 A1	29-06-2006
		EP 1838733 A2	03-10-2007
		JP 2008523841 T	10-07-2008
		KR 20070116217 A	07-12-2007
		US 2008267971 A1	30-10-2008
		UY 29288 A1	31-07-2006
WO 2006069202 A	29-06-2006	AR 053318 A1	02-05-2007
		AU 2005319176 A1	29-06-2006
		BR PI0519775 A2	10-02-2009
		CA 2591304 A1	29-06-2006
		CN 101128484 A	20-02-2008
		EP 1828248 A2	05-09-2007
		JP 2008525034 T	17-07-2008
		KR 20070100317 A	10-10-2007
		ZA 200705732 A	25-06-2008

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/105269
PCT/US2009/001122

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

PENN, Michael, G.
Amgen Inc.
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 24 June 2010 (24.06.2010)		
Applicant's or agent's file reference A1382-WO-PCT	**IMPORTANT NOTICE**	
International application No. PCT/US2009/001122	International filing date *(day/month/year)* 20 February 2009 (20.02.2009)	Priority date *(day/month/year)* 20 February 2008 (20.02.2008)
Applicant AMGEN INC. et al		

1. **ATTENTION**: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93*bis*.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
27 August 2009 (27.08.2009)

   AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93*bis*.1 :

   AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS for entry into the national phase**

   For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph,** be **30 MONTHS** from the priority date.

   In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Beate Giffo-Schmitt

e-mail: pt03.pct@wipo.int

WO 2009/105269
PCT/US2009/001122

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

PENN, Michael, G.
Amgen Inc.
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 24 September 2009 (24.09.2009)		
Applicant's or agent's file reference A1382-WO-PCT	**IMPORTANT NOTICE**	
International application No. PCT/US2009/001122	International filing date *(day/month/year)* 20 February 2009 (20.02.2009)	Priority date *(day/month/year)* 20 February 2008 (20.02.2008)
Applicant AMGEN INC. et al		

1. **ATTENTION**: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93*bis*.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
27 August 2009 (27.08.2009)

   None

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93*bis*.1 :

   LU, TZ, UG

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS for entry into the national phase**

   For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of **19 months** from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph,** be **20 MONTHS** from the priority date.

   In practice, **time limits other than the 20-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Beate Giffo-Schmitt

e-mail: pt03.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:

DAVID B. RAN
AMGEN INC.
LAW DEPARTMENT
1201 AMGEN COURT WEST
SEATTLE, WASHINGTON 98119

PCT

NOTIFICATION CONCERNING PAYMENT OF PRESCRIBED FEES

(PCT Rules 12bis.1(c), 14, 15 and 16 and Administrative Instructions, Sections 102*bis*(c), 304, 323(b), 707(b) and 803)

Date of mailing *(day/month/year)*	10 Mar 2009
Applicant's or agent's file reference: A1382-WO-PCT	PAYMENT DUE: see item 3 for time limits

International application No.	International filing date/Date of receipt *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2009/001122	20 Feb 2009	20 Feb 2008

Applicant: AMGEN INC.

1. The applicant is hereby notified that this receiving Office has received:

☐ the payment of all the prescribed fees, and ☒ an overpayment, which will be refunded in due course.

☐ no or insufficient payment of the prescribed fees and the applicant is hereby invited to pay the balance due, as summarized under item 2, within the time limit(s) indicated under item 3.

2. Fees and payment calculation:

5,169.00	–	5,449.00	=	-280.00
Total fees payable		Amount paid		Balance

☐ The details of the calculation are given in the Annex.

3. Time limit(s) for payment and amount(s) payable (Rules 14.1, 15.4 and 16.1(f)):

☐ within ONE MONTH from the date of receipt of the international application (for the transmittal fee (if any), the search fee and the international filing fee). The amount payable for each fee is the amount applicable on the date of receipt of the international application.

☐ within 16 MONTHS from the priority date (only for the fee for priority document). The applicant's attention is drawn to the fact that the request made by the applicant under Rule 17.1(b) will be considered not to have been made unless the fee is paid within that time limit.

4. Additional observations *(if necessary)*:

☐ The search copy will not be transmitted to the International Searching Authority until the search fee is paid (therefore the start of the international search will be delayed) (Rule 23.1(a) and (b)).

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Zeta Adams Telephone No. 703-308-9290 EX 127

Form PCT/RO/102 (July 2008)

286

ANNEX TO FORM PCT/RO/102
CALCULATION OF THE PRESCRIBED FEES

International application No.
PCT/US2009/001122

T Transmittal Fee

Prescribed amount:		240.00 T	
Amount paid:	−	240.00	☒ correct amount
Balance:	=	0.00	☐ overpayment
			☐ balance due

S Search Fee

Prescribed amount:		2,410.00 S	
Amount paid:	−	2,410.00	☒ correct amount
Balance:	=	0.00	☐ overpayment
			☐ balance due

I International Filing Fee

Fixed amount for first 30 sheets: 1,119.00 i1

100 (Number of sheets in excess of 30) x 14.00 (Fee per sheet) = 1,400.00 i2

Additional component: . . . 400 x 0.00 (Fee per sheet) = 0.00 i3

Reduction where the international application is filed *(See PCT Applicant's Guide, International Phase for details on the availability of this reduction)*:

using the PCT-EASY software:	−	0.00 r
or		
in electronic form where the text of the description, claims and abstract is not in character coded format:	−	0.00 r
or		
in electronic form where the text of the description, claims and abstract is in character coded format:	−	0.00 r
Sub-total:	=	2,519.00 i1+i2+i3-r

Applicants from certain States are entitled to a reduction of 90% of the international filing fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 10% of the sub-total entered at (i1+i2+i3-r); (see Notes to the Fee Calculation Sheet as annexed to the Request Form, PCT/RO/101, for details): = 2,519.00 I

Amount paid:	−	2,799.00	☐ correct amount
Balance:	=	-280.00	☒ overpayment
			☐ balance due

P Fee for Priority Document

Prescribed amount:		0.00 P	
Amount paid:	−	0.00	☒ correct amount
Balance:	=	0.00	☐ overpayment
			☐ balance due

ES Fee for Earlier Search Documents

Prescribed amount:		0.00 ES	
Amount paid:	−	0.00	☐ correct amount
Balance:	=	0.00	☐ overpayment
			☐ balance due

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCT

To:
DAVID B. RAN
AMGEN INC.
LAW DEPARTMENT
1201 AMGEN COURT WEST
SEATTLE, WASHINGTON 98119

Confirmation No: 5652

NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION NUMBER AND OF THE INTERNATIONAL FILING DATE

(PCT Rule 20.2(c))

Date of mailing *(day/month/year)*	10 Mar 2009
Applicant's or agent's file reference: A1382-WO-PCT	**IMPORTANT NOTIFICATION**

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2009/001122	20 Feb 2009	20 Feb 2008

Applicant
AMGEN INC.

Title of the invention
ANTIBODIES DIRECTEDTO ANGIOPOIETIN-1 AND ANGIOPOIETIN-2 AND USES THEREOF

1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.

2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:

☒ was transmitted to the International Bureau on 10 Mar 2009

☐ has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:

☐ because the necessary national security clearance has not yet been obtained.

☐ because *(reason to be specified)*:

* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).

3. FOREIGN TRANSMITTAL LICENSE INFORMATION Completed by: ZA

☐ Additional license for foreign transmittal not required. This subject matter is covered by a license already granted or the equivalent U.S. national application. Refer to that license for information concerning its scope.

☐ License for foreign transmittal not required. 37 CFR. 5.11(e)(1) or 37 CFR 5.11(e)(2). However, a license may be required for additional subject matter. See 37 CFR 5.15(b).

☒ Foreign transmittal license granted. 35 U.S.C. 184; 37 CFR 5.11 on 04 Mar 2009 (date):

☐ 37 CFR 5.15(a) ☒ 37 CFR 5.15(b)

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	Zeta Adams
Facsimile No. 571-273-3201	Telephone No. 703-308-9290 EX 127

Form PCT/RO/105 (July 2008)

288

PATENT COOPERATION TREATY

POWER OF ATTORNEY

The undersigned applicant:

AMGEN INC.

hereby appoints:

Stuart L. Watt (Reg. No. 32,511)
Scott L. Ausenhus (Reg. No. 42,271)
Rekha P. Bansal (Reg. No. 36,440
Christine M. Bellas (Reg. No. 34,122)
Scott N. Bernstein (Reg. No. 38,827)
Lawrence B. Bugaisky (Reg. No. 35,086)
Joseph W. Bulock (Reg. No. 37,103)
Todd M. Crissey (Reg. No. 37,807)
Kathleen Fowler (Reg. No. 40,611)
Bernard P. Friedrichsen (Reg. No. 44,689)
J. Antonio Garcia-Rivas (Reg. No. 42,567)
Timothy J. Gaul (Reg. No. 33,111)
Mary Kymne Hehman (Reg. No. 39,206)
Ronald S. Hermenau (Reg. No. 34,620)
Petrina S. Hsi (Reg. No. 38,496)
James E. Klaniecki (Reg. No. 38,207)
John A. Lamerdin (Reg. No. 44,858)
Susan E. Lingenfelter (Reg. No. 41,156)
Nathan A. Machin (Reg. No. 47,763)
Olga Mekhovich *(Limited Recognition Under 37CFR § 11.9(b) - L0066)*
Randolph N. Mohr (Reg. No. 45,590)
Kimberlin L. Morley (Reg. No. 35,391)
Karen L. Nicastro (Reg. No. 35,968)
Patricia A. Perkins (Reg. No. 34,693)
Richard V. Person (Reg. No. 42,991)
Robert T. Ramos (Reg. No. 37,915)
David B. Ran (Reg. No. 38,589)
G. Prabhakar Reddy (Reg. No. 47,890)
Raz F. Reinecke (Reg. No. 34,331)
Melissa A. Shaw (Reg. No. 38,301)
Charles K. Sholtz (Reg. No. 38,615)
Christopher J. Smith (Reg. No. 40,179)
Julie K. Smith (Reg. No. 38,619)
Nisan A. Steinberg (Reg. No. 40,345)
Rosemary Sweeney (Reg. No. 52,264)
Paul B. Tran (Reg. No. 41,565)
Frank S. Ungemach (Reg. No. 34,449)
Wendy A. Whiteford (Reg. No. 36,964)
Robert B. Winter (Reg. No. 34,458)
Thomas J. Wrona (Reg. No. 44,410)

all of:

AMGEN INC.
One Amgen Center Drive, M/S 28-2-C
Thousand Oaks, California 91320-1799
United States of America

as Agents to act on its behalf before the competent International Authorities in connection with any and all international applications filed by it with the US Patent and Trademark Office as Receiving Office and to make or receive payments on its behalf.

Place: Thousand Oaks, California

AMGEN INC.

Date: June 9, 2008

Stuart L. Watt

Stuart L. Watt
Vice President, Law

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2009/001122

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF DEFECTS IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

(PCT Articles 3(4)(i) and 14(1) and Rule 28.1)

To:

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Attention: Larry Stephens
Room 7A13, South Tower
2900 Crystal Drive
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as receiving Office

Date of mailing *(day/month/year)*	
10 March 2009 (10.03.2009)	
International application No. PCT/US2009/001122	International filing date *(day/month/year)* 20 February 2009 (20.02.2009)
Applicant	AMGEN INC. et al

1. ☒ The International Bureau hereby calls the attention of the receiving Office to the defects **in the international application as filed**, which are specified on the attached:
   - ☒ Annex A
   - ☐ Annex B1 *(text matter of the international application as filed)*
   - ☐ Annex C1 *(drawings of the international application as filed)*

2. ☐ The International Bureau hereby calls the attention of the receiving Office to the defects **in the translation of the international application** furnished under Rule 12.3 or 12.4, which are specified on the attached:
   - ☐ Annex A
   - ☐ Annex B2 *(text matter of the translation of the international application)*
   - ☐ Annex C2 *(drawings of the translation of the international application)*

Additional observations *(if necessary)*:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Thorax Bernard
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

290

ANNEX A TO FORM PCT/IB/313

International application No.
PCT/US2009/001122

The International Bureau has found the following defects in the international application as filed:

1. As to **signature** of the international application (Rules 4.15, 26.2*bis*(a) and 90.4), the request:
   a. ☐ is not signed* by the applicant or, if there is more than one applicant, by at least one of them
   b. ☐ is not accompanied by the statement referred to in the check list in Box No. IX of the request explaining the lack of the signature of an applicant for the designation of the United States of America
   c. ☐ is signed by what appears to be an agent/common representative but:
      ☐ the international application is not accompanied by a power of attorney appointing him
      ☐ the power of attorney accompanying the international application is not signed by all the applicants
   d. ☐ other *(specify)*:

* Although Rule 4.15 requires that all applicants must sign the request (e.g. including all inventors/applicants for the designation of the United States of America), for the purposes of Article 14(1)(a)(i), if there is more than one applicant, it shall be sufficient that the request be signed by one of them (Rule 26.2*bis*(a)).

However, the applicant's attention is drawn to the fact that the national law applied by each designated Office may require, in connection with the processing of the international application in the national phase, that the applicant furnish the confirmation of the international application by the signature of any applicant for the designated State who has not signed the request (Rule 51*bis*.1(a)(vi)).

2. As to indications concerning the **applicant*** who is entitled, according to Rule 19.1, to file the international application with the receiving Office, the request (Rules 4.4, 4.5 and 26.2*bis*(b)):
   a. ☐ does not properly indicate the applicant's name *(specify)*:
   b. ☐ does not indicate the applicant's address
   c. ☐ does not properly indicate the applicant's address *(specify)*:
   d. ☐ does not indicate the applicant's nationality
   e. ☐ does not indicate the applicant's residence
   f. ☐ further observations about indications concerning other applicants (if applicable):

* Although Rules 4.4 and 4.5 require indications concerning the applicant, or if there are several applicants, of each of them, for the purposes of Article 14(1)(a)(ii), if there is more than one applicant, it shall be sufficient that the indications required under Rule 4.5(a)(ii) and (iii) be provided in respect of one of them who is entitled according to Rule 19.1 to file the international application with the receiving Office (Rule 26.2*bis*(b)).

However, the applicant's attention is drawn to the fact that the national law applied by each designated Office may require, in connection with the processing of the international application in the national phase, that the applicant furnish any missing indication required under Rule 4.5(a)(ii) and (iii) in respect of any applicant for the designated State (Rule 51*bis*.1(a)(vii)).

3. As to the **language** of certain elements of the international application, other than the description and claims (Rules 12.1(c) and 26.3*ter*(a) and (c)):
   a. ☐ the **request** is not in a language of publication accepted by this receiving Office; (the) language(s) accepted by this receiving Office is/are:
   b. ☐ the **text matter of the drawings** is not in the language in which the international application is to be published, which is:
   c. ☐ the **abstract** is not in the language in which the international application is to be published, which is:

4. The **title** of the invention:
   a. ☐ is not indicated in Box No. I of the request (Rule 4.1(a))
   b. ☐ is not indicated at the top of the first sheet of the description (Rule 5.1(a))
   c. ☒ as appearing in Box No. I of the request is not identical with the title heading the description (Rule 5.1(a))

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2009/001122

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

RAN, David, B.
Amgen Inc.
Law Department
1201 Amgen Court West
Seattle, Washington 98119
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*	IMPORTANT NOTIFICATION
10 March 2009 (10.03.2009)	
Applicant's or agent's file reference	International application No.
A1382-WO-PCT	PCT/US2009/001122

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

AMGEN INC. (for all designated States except US)
BOONE, Thomas, C. et al (for US)

International filing date: 20 February 2009 (20.02.2009)

Priority date(s) claimed: 20 February 2008 (20.02.2008)
16 June 2008 (16.06.2008)
19 December 2008 (19.12.2008)

Date of receipt of the record copy by the International Bureau: 07 March 2009 (07.03.2009)

List of designated Offices:

AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR
OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

ATTENTION: The applicant should carefully check the data appearing in this notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau. **In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex**, relating to:

- time limits for entry into the national phase - **see updated important information (as of April 2002)**
- requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Thorax Bernard
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

ANNEX TO FORM PCT/IB/301

International application No.
PCT/US2009/001122

INFORMATION ON ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the **"national phase" must be entered** before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with **other special requirements** applicable in certain Offices. It is the **applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The **applicable time limit** for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time**, in respect of certain designated or elected Offices. For **regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit)**, Office by Office, refer to the *PCT Gazette* ("Section IV" part published on a weekly basis), to the *PCT Newsletter* (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the *PCT Applicant's Guide* (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages of the site, including those of the *Gazette*, *Newsletter* and *Guide*, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

Information about the requirements for **filing a demand for international preliminary examination** is set out in the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before the date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau and if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 2(xi)(b)).

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2009/001122

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

RAN, David, B.
Amgen Inc.
Law Department
1201 Amgen Court West
Seattle, Washington 98119
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 11 March 2009 (11.03.2009)	
Applicant's or agent's file reference A1382-WO-PCT	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US2009/001122	International filing date *(day/month/year)* 20 February 2009 (20.02.2009)
International publication date *(day/month/year)* **Not yet published**	Priority date *(day/month/year)* 20 February 2008 (20.02.2008)
Applicant AMGEN INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote **a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau** under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)***An asterisk (*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes **a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
20 February 2008 (20.02.2008)	61/066,632	US	NR
16 June 2008 (16.06.2008)	61/061,943	US	07 March 2009 (07.03.2009)
19 December 2008 (19.12.2008)	61/139,361	US	07 March 2009 (07.03.2009)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Beate Giffo-Schmitt
e-mail PT03.PCT@WIPO.INT
Telephone No. +41 22 338 74 03

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:

DAVID B. RAN
AMGEN INC.
LAW DEPARTMENT
1201 AMGEN COURT WEST
SEATTLE, WASHINGTON 98119

PCT

NOTIFICATION CONCERNING PAYMENT OF PRESCRIBED FEES

(PCT Rules 12bis.1(c), 14, 15 and 16 and Administrative Instructions, Sections 102*bis*(c), 304, 323(b), 707(b) and 803)

Date of mailing *(day/month/year)*	02 Apr 2009
Applicant's or agent's file reference: A1382-WO-PCT	**PAYMENT DUE** see item 3 for time limits

International application No.	International filing date/Date of receipt *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2009/001122	20 Feb 2009	20 Feb 2008

Applicant: AMGEN INC.

1. The applicant is hereby notified that this receiving Office has received:

☒ **the payment** of all the prescribed fees, and ☐ **an overpayment**, which will be refunded in due course.

☐ **no or insufficient payment** of the prescribed fees and the applicant is hereby **invited to pay the balance due**, as summarized under item 2, within the time limit(s) indicated under item 3.

2. **Fees and payment calculation:**

5,169.00	–	5,169.00	=	0.00
Total fees payable		Amount paid		Balance

☐ The details of the calculation are given in the Annex.

3. **Time limit(s) for payment and amount(s) payable (Rules 14.1, 15.4 and 16.1(f)):**

☐ within ONE MONTH from the date of receipt of the international application (**for the transmittal fee** (if any), **the search fee** and **the international filing fee**). The amount payable for each fee is the amount applicable on the date of receipt of the international application.

☐ within 16 MONTHS from the priority date (only for the fee for priority document). The applicant's attention is drawn to the fact that the request made by the applicant under Rule 17.1(b) will be considered not to have been made unless the fee is paid within that time limit.

4. Additional observations *(if necessary)*:

☐ The search copy will not be transmitted to the International Searching Authority until the search fee is paid (therefore the start of the international search will be delayed) (Rule 23.1(a) and (b)).

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Zeta Adams Telephone No. 703-308-9290 EX 127

Form PCT/RO/102 (July 2008)

295

ANNEX TO FORM PCT/RO/102
CALCULATION OF THE PRESCRIBED FEES

International application No.
PCT/US2009/001122

[T] Transmittal Fee

Prescribed amount:		240.00 [T]	
Amount paid:	–	240.00	☒ correct amount
Balance:	=	0.00	☐ overpayment
			☐ balance due

[S] Search Fee

Prescribed amount:		2,410.00 [S]	
Amount paid:	–	2,410.00	☒ correct amount
Balance:	=	0.00	☐ overpayment
			☐ balance due

[I] International Filing Fee

Fixed amount for first 30 sheets: 1,119.00 [i1]

100 (Number of sheets in excess of 30) x 14.00 (Fee per sheet) = 1,400.00 [i2]

Additional component: . . .400 x 0.00 (Fee per sheet) = 0.00 [i3]

Reduction where the international application is filed *(See PCT Applicant's Guide, International Phase for details on the availability of this reduction)*:

using the PCT-EASY software: – 0.00 [r]

or

in electronic form where the text of the description, claims and abstract **is not** in character coded format: – 0.00 [r]

or

in electronic form where the text of the description, claims and abstract is in character coded format: – 0.00 [r]

Sub-total: = 2,519.00 [i1+i2+i3-r]

Applicants from certain States are entitled to a reduction of 90% of the international filing fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 10% of the sub-total entered at (i1+i2+i3-r); (see Notes to the Fee Calculation Sheet as annexed to the Request Form, PCT/RO/101, for details): = 2,519.00 [I]

Amount paid:	–	2,519.00	☒ correct amount
Balance:	=	0.00	☐ overpayment
			☐ balance due

[P] Fee for Priority Document

Prescribed amount:		0.00 [P]	
Amount paid:	–	0.00	☒ correct amount
Balance:	=	0.00	☐ overpayment
			☐ balance due

[ES] Fee for Earlier Search Documents

Prescribed amount:		0.00 [ES]	
Amount paid:	–	0.00	☐ correct amount
Balance:	=	0.00	☐ overpayment
			☐ balance due

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:

DAVID B. RAN
AMGEN INC.
LAW DEPARTMENT
1201 AMGEN COURT WEST
SEATTLE, WASHINGTON 98119

Confirmation No: 5652

PCT

COMMUNICATION IN CASES FOR WHICH NO OTHER FORM IS APPLICABLE

	Date of mailing *(day/month/year)* 13 Apr 2009
Applicant's or agent's file reference A1382-WO-PCT	**REPLY DUE** See paragraph 1 below
International application No. PCT/US2009/001122	International filing date *(day/month/year)* 20 Feb 2009
Applicant AMGEN INC.	

1. ☐ REPLY DUE within _____ months/days from the above date of mailing

☐ NO REPLY DUE, however, see below _____

☒ IMPORTANT COMMUNICATION

☐ INFORMATION ONLY

2. COMMUNICATION:

The Title of the Invention as appearing in box No. I of the Request is not identical with the Title Heading Description (Rule 5.1(a)).

Please clarify.

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer Zeta Adams Telephone No. 703-308-9290 EX 127

Form PCT/RO/132 (July 1992; reprint January 2004)

297

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:

DAVID B. RAN
AMGEN INC.
LAW DEPARTMENT
1201 AMGEN COURT WEST
SEATTLE, WASHINGTON 98119

RECEIVED
APR 10 2009
AMGEN LAW DEPARTMENT

Confirmation No: 5652

PCT

COMMUNICATION IN CASES FOR WHICH NO OTHER FORM IS APPLICABLE

Applicant's or agent's file reference: A1382-WO-PCT	Date of mailing *(day/month/year)*: 13 Apr 2009
International application No.: PCT/US2009/001122	REPLY DUE: See paragraph 1 below
Applicant: AMGEN INC.	International filing date *(day/month/year)*: 20 Feb 2009

1. ☐ REPLY DUE within _____ months/days from the above date of mailing

☐ NO REPLY DUE, however, see below _____

☒ IMPORTANT COMMUNICATION

☐ INFORMATION ONLY

2. COMMUNICATION:

The Title of the Invention as appearing in box No. I of the Request is not identical with the Title Heading Description (Rule 5.1(a)).

Please clarify.

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer Zeta Adams Telephone No. 703-308-9290 EX 127

Form PCT RO/132 (July 1992; reprint January 2004)

298

A1382-WO-PCT

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

0	**For receiving Office use only**	
0-1	International Application No.	PCT/US09/01122
0-2	International Filing Date	20 FEB 2009 (20.02.09)
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	RO/US

0-4	**Form PCT/RO/101 PCT Request**	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.038.214 MT/FOP 20090301/0.20.5.15
0-5	**Petition** The undersigned requests that the present International application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	**Receiving Office (specified by the applicant)**	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	**Applicant's or agent's file reference**	A1382-WO-PCT
I	**Title of invention**	ANTIBODIES DIRECTED TO ANGIOPOIETIN-1 AND ANGIOPOIETIN-2 AND USES THEREOF
II	**Applicant**	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	AMGEN INC.
II-5	Address	One Amgen Center Drive Thousand Oaks, California 91320 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	206-265-7000
II-9	Facsimile No.	206-233-0644

Substitute Sheet

Electronically filed: 06.04.09

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

In the Application of: AMGEN INC. Docket No.: A1382-WO-PCT

International Application No.: PCT/US2009/001122

International Filing Date: 20 February 2009

For: ANTIBODIES DIRECTED TO ANGIOPOIETIN-1 AND ANGIOPOIETIN-2 AND USES THEREOF

REQUEST FOR THE RECORDING OF A CHANGE UNDER RULE 92bis

Mail Stop PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450
Attn: United States Receiving Office

Sir:

Pursuant to PCT Rule 92bis, Applicant requests that the Receiving Office and the International Bureau record a change in the person, name and address of the agent as it appears in the PCT Request form (Form PCT/RO/101). Enclosed herewith is a substitute page 2 of the PCT Request form (Form PCT/RO/101), showing the change to Box No. IV-1, *Agent or Common Representative*; *or address for correspondence*, as follows:

Michael G. Penn, Registration No. 55,532
AMGEN INC.
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320
USA
Telephone: 805-447-8636
Facsimile: 805-499-8011

Applicant respectfully requests that the substitute page 2 of the PCT Request form (Form PCT/RO/101) be made of record in the present application file. An updated General Power of Attorney is attached hereto.

Please direct all correspondence and telephone calls in connection with the present application to the above-named Agent of Record.

Applicant believes that no fee is due in connection with this request; however, in the event that a fee is required, please charge the required fee to the Amgen Inc. Deposit Account No. 01-0523.

Respectfully submitted,

Amgen Inc.
Law Department
1201 Amgen Court West
Seattle, Washington 98119

David B. Ran
Registration No. 38,589
(206) 265-7309

CERTIFICATE OF EFS TRANSMISSION

I hereby certify that the attached correspondence is being filed with the United States Patent and Trademark Office via EFS transmission on the date indicated below, and is addressed to Mail Stop PCT, ATTN: United States Receiving Office, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450.

Date: June 4, 2009 By: Camilla Edwards
Camilla Edwards

300

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:

MICHAEL G. PENN
AMGEN INC.
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CALIFORNIA 91320

PCT

NOTIFICATION CONCERNING REPRESENTATION

(PCT Rule 90 and Administrative Instructions, Section 328)

Applicant's or agent's file reference	Date of mailing *(day/month/year)*
A1382-WO-PCT	11 Jun 2009
International application No.	**International filing date *(day/month/year)***
PCT/US2009/001122	20 Feb 2009
Applicant	
AMGEN INC.	

1. This receiving Office hereby gives notice of the receipt of a document containing:

   - [x] a power of attorney
   - [ ] a revocation of power of attorney
   - [ ] a renunciation of appointment

2. This notification, together with a copy of the document indicated above, is sent to the addressee in its capacity as:

   - [x] the International Searching Authority.
   - [x] the International Bureau, which is requested to record a change in the person of the agent or common representative under Rule 92*bis*.1(a)(ii).

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	Zeta Adams
Facsimile No. 571-273-3201	Telephone No. 703-756-1417

Form PCT/RO/123 (July 1992; reprint January 2004)

301

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2009/001122

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

PENN, Michael, G.
Amgen Inc.
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
10 June 2009 (10.06.2009)

Applicant's or agent's file reference
A1382-WO-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2009/001122

International filing date *(day/month/year)*
20 February 2009 (20.02.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address

RAN, David, B.
Amgen Inc.
Law Department
1201 Amgen Court West
Seattle, Washington 98119
United States of America

State of Nationality:
State of Residence:
Telephone No.: 206-265-7309
Facsimile No.: 206-233-0644
E-mail address: dran@amgen.com

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

PENN, Michael, G.
Amgen Inc.
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320
United States of America

State of Nationality:
State of Residence:
Telephone No.: 805-447-8636
Facsimile No.: 805-499-8011
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The appointment of the agent of record has been revoked. A new agent has been appointed, as indicated in Box 2. The new agent's file reference remains the same.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☒ other: RAN, David, B.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Porohovski Youri
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

Form PCT/IB/306 (January 2009) 1/D25ZHMUF0

302

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
A1382-WO-PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2009/001122	20/02/2009	20/02/2008
Applicant.		
AMGEN INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:

   [X] the international application in the language in which it was filed

   [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**

   [ ] the text is approved as submitted by the applicant

   [X] the text has been established by this Authority to read as follows:

   ANTIBODIES DIRECTED TO ANGIOPOIETIN-1 AND ANGIOPOIETIN-2 AND USES THEREOF

5. With regard to the **abstract,**

   [X] the text is approved as submitted by the applicant

   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**

   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

   [ ] as suggested by the applicant

   [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

   [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/001122

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in electronic form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/001122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/22 A61K39/395 A61P35/00
ADD. C07K19/00 C07K14/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/045049 A (AMGEN INC [US]; OLINER JONATHON DANIEL [US]; GRAHAM KEVIN [US]) 27 April 2006 (2006-04-27) figure 1; examples 4,5; tables 2-4,7-11; sequences 11, 12	1-17
X	WO 2006/068953 A (ABGENIX INC [US]; ASTRAZENECA AB [SE]; GREEN LARRY L [US]; ZHOU QING [) 29 June 2006 (2006-06-29) examples 1-4,8-13,17,19-23; tables 8,10	1-17
X	WO 2006/069202 A (AMGEN INC [US]; CALZONE FRANK J [US]; DESHPANDE RAJENDRA V [US]; TSAI) 29 June 2006 (2006-06-29) figure 4	6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 June 2009	17/06/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Fax: (+31–70) 340–3016	Luyten, Kattie

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/001122

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006045049 A	27-04-2006	AU 2005295260 A1	27-04-2006
		CA 2583910 A1	27-04-2006
		EP 1805219 A1	11-07-2007
		KR 20070085408 A	27-08-2007
WO 2006068953 A	29-06-2006	AR 052065 A1	28-02-2007
		AU 2005319382 A1	29-06-2006
		BR PI0519596 A2	24-03-2009
		CA 2595610 A1	29-06-2006
		EP 1838733 A2	03-10-2007
		JP 2008523841 T	10-07-2008
		KR 20070116217 A	07-12-2007
		US 2008267971 A1	30-10-2008
		UY 29288 A1	31-07-2006
WO 2006069202 A	29-06-2006	AR 053318 A1	02-05-2007
		AU 2005319176 A1	29-06-2006
		BR PI0519775 A2	10-02-2009
		CA 2591304 A1	29-06-2006
		CN 101128484 A	20-02-2008
		EP 1828248 A2	05-09-2007
		JP 2008525034 T	17-07-2008
		KR 20070100317 A	10-10-2007
		ZA 200705732 A	25-06-2008

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/105269
PCT/US2009/001122

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
AVAILABILITY OF THE PUBLICATION
OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

To:

PENN, Michael, G.
Amgen Inc.
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 27 August 2009 (27.08.2009)		
Applicant's or agent's file reference A1382-WO-PCT	**IMPORTANT NOTICE**	
International application No. PCT/US2009/001122	International filing date *(day/month/year)* 20 February 2009 (20.02.2009)	Priority date *(day/month/year)* 20 February 2008 (20.02.2008)
Applicant AMGEN INC. et al		

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:

☑ has **published** the above-indicated international application on 27 August 2009 (27.08.2009) under No. WO 2009/105269

☐ has **republished** the above-indicated international application on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (*as the case may be*) on the front page of the published international application.

A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address: www.wipo.int/pctdb (in the appropriate field of the structured search, enter the PCT or WO number).

The applicant may also obtain a paper copy of the published international application from the International Bureau by sending an e-mail to patentscope@wipo.int or by submitting a written request to the contact details provided below.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Beate Giffo-Schmitt

e-mail: pt03.pct@wipo.int

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-107938- -00000-0000
Fecha: 2010-09-01 15:17:05 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 307

IES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐