



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5



No. 13-206276-00000-0000

Fecha: 2013-08-30 16:08:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-058563-00008-0000

Fecha: 2013-08-30 16:08:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 2

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 11-058.563A

54. TÍTULO "ANTICUERPOS CONTRA LA
ANGIOPOYETINA 2 HUMANA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/22

71. SOLICITANTE F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO BASILEA, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

30 AGO 2013

22. BOGOTÁ, D.C. _____

(FORMA P 10)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-206276-00000-0000

Fecha: 2013-08-30 16:08:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-058563-00008-0000

Fecha: 2013-08-30 16:08:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 2

**DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES**

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del Solicitante:

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Nombre o Denominación / Nombre o Razón Social Completa

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Nombre Representante Legal

Tipo de Empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de Identificación

☒ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro Número

39.690.713

Nacionalidad / País de Constitución	Dirección y Domicilio del Titular	Ciudad
Suiza	Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basilea, Suiza	Basilea
Dirección Electrónica		Fax
notificacionespatentes@lloredacamacho.com		6069701
		Número Telefónico
		3264270

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del Apoderado:

LLOREDA RICAURTE ALICIA

Apellidos y Nombre

C.C. 39.690.713

Documento de Identificación

53.215

Tarjeta Profesional

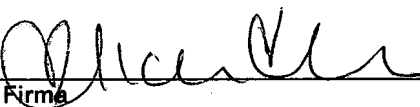
Dirección y Domicilio		Ciudad
Calle 72 No. 5-83 Piso 5°		Bogotá D.C.
Dirección Electrónica		No. Fax
notificacionespatentes@lloredacamacho.com		6069701
		Número Telefónico
		3264270

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del Trámite		
CONVERSIÓN Expediente _____ De: _____ A: _____	DIVISIÓN Expediente <u>11-058.563</u> De: <u>11-058.563</u> A: <u>11-058.563A</u>	FUSIÓN Expediente _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No. <u>13-0037611</u>	Fecha: <u>Abril 23, 2013</u>
--	------------------------------

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación. ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación. ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división. ☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud. ☒ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma		
ALICIA LLOREDA RICAURTE		
Nombre y apellidos	Representante Apoderado	Firma
C.C. 39.690.713 de Usaquén		53.215
Identificación		Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

4
2

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0037611
		Bogotá D.C., Abril 23 de 2013 - 08:20:33

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.	NI 830.022.145
-----------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	534292732	22/04/2013	19.279.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
			\$450.000.00
=====			

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-058563- -00008-0000
Fecha: 2013-08-30 16:08:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-206276- -00000-0000
Fecha: 2013-08-30 16:08:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 2

... SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Antibodies against human Angiopoietin 2

<130> 25688

<150> EP 08021835.7

<151> 2008-12-16

<160> 63

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 1

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

Ala	Phe	Asp	Ile
			20

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 2

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

Gly

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 3

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 4

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

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

<220>
<223> light chain CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 5

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 6

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

<210> 7
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> heavy chain variable domain, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

- 3 -

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 8
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain variable domain, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> heavy chain CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 9

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

Ala Phe Asp Ile
20

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

<220>
<223> heavy chain CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 10

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

Gly

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> heavy chain CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 11

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07
<400> 12

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

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07
<400> 13

Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07
<400> 14

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

<210> 15
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> heavy chain variable domain, <ANG-2>Ang2i_LC07
<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain variable domain, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> heavy chain CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 17

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

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

<220>
<223> heavy chain CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 18

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

Gly

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> heavy chain CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 19

Ser Tyr Gly Met His
1 5

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

<220>
<223> light chain CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 20

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

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 21

Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

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

<220>
<223> light chain CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 22

Ser Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn
1 5 10

<210> 23
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 23

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> heavy chain CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 25

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
1 5

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

<220>
<223> heavy chain CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 26

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

Val Lys Gly

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

<220>
<223> heavy chain CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 27

Asn Ala Trp Met Ser
1 5

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

<220>
<223> light chain CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 28

Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro
1 5

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

<220>
<223> light chain CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 29

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

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

<220>
<223> light chain CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 30

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

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

<220>
<223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 31

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

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

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

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

- 12 -

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>

<223> heavy chain CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 33

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

Ala Phe Asp Ile
20

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 34

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

Gly

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 35

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 36

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

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

<220>
<223> light chain CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 37

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

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

<220>
<223> light chain CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 38

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

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

<220>
<223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 39

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

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

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

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

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

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

- 15 -

85

90

95

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

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

Ser

<210> 40

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 40

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 41

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

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 42

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

Gly

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 43

Ser	Tyr	Gly	Met	His
1				5

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 44

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

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 46

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

<210> 47

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 47

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 48

<211> 106

<212> PRT.

<213> Artificial

<220>

<223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2k_LC11

<220>

<221> misc_feature

<222> (98)..(98)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (102)..(102)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> heavy chain CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 49

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
1 5

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

<220>
<223> heavy chain CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 50

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

Val Lys Gly

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

<220>
<223> heavy chain CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 51

Asn Ala Trp Met Ser
1 5

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

<220>
<223> light chain CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 52

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

<210> 53
<211> 7
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 53

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 54

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Arg Leu Asn

1 5 10

<210> 55

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 55

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala

50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

- 21 -

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

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

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

[illegible]

130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 59
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

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

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> 60
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100

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

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val

195					200					205					
Arg	Arg	Cys	Glu	Ala	Gln	Lys	Trp	Gly	Pro	Glu	Cys	Asn	His	Leu	Cys
	210					215					220				
Thr	Ala	Cys	Met	Asn	Asn	Gly	Val	Cys	His	Glu	Asp	Thr	Gly	Glu	Cys
225					230					235					240
Ile	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Met	Gly	Arg	Thr	Cys	Glu	Lys	Ala	Cys	Glu
				245					250					255	
Leu	His	Thr	Phe	Gly	Arg	Thr	Cys	Lys	Glu	Arg	Cys	Ser	Gly	Gln	Glu
			260					265					270		
Gly	Cys	Lys	Ser	Tyr	Val	Phe	Cys	Leu	Pro	Asp	Pro	Tyr	Gly	Cys	Ser
		275					280					285			
Cys	Ala	Thr	Gly	Trp	Lys	Gly	Leu	Gln	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	His	Pro
	290					295					300				
Gly	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asp	Cys	Lys	Leu	Arg	Cys	Ser	Cys	Asn	Asn	Gly
305					310					315					320
Glu	Met	Cys	Asp	Arg	Phe	Gln	Gly	Cys	Leu	Cys	Ser	Pro	Gly	Trp	Gln
				325					330					335	
Gly	Leu	Gln	Cys	Glu	Arg	Glu	Gly	Ile	Pro	Arg	Met	Thr	Pro	Lys	Ile
			340					345					350		
Val	Asp	Leu	Pro	Asp	His	Ile	Glu	Val	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Pro
		355					360					365			
Ile	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Trp	Pro	Leu	Pro	Thr	Asn	Glu	Glu	Met	Thr
	370					375					380				
Leu	Val	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Leu	His	Pro	Lys	Asp	Phe	Asn	His
385					390					395					400
Thr	Asp	His	Phe	Ser	Val	Ala	Ile	Phe	Thr	Ile	His	Arg	Ile	Leu	Pro
				405					410					415	
Pro	Asp	Ser	Gly	Val	Trp	Val	Cys	Ser	Val	Asn	Thr	Val	Ala	Gly	Met
			420					425					430		

Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu
435 440 445

Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn
450 455 460

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>

<223> Human angiopoietin-2 (ANG-2) with leader and His-tag

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile
 405 410 415

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

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

435 440 445

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

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

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

Ser Gly His His His His His His
500

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

<220>
<223> Human angiopoietin-1 (ANG-1) with leader and His-tag

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
305 310 315 320

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

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

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

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

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la angiopoyetina-2 humana (ANG-2), caracterizado porque:

a) El dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de la SEQ ID NO: 33, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 34 y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 35; y,

b) El dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de la SEQ ID NO: 36, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 37 y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 38.

2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:

a) el dominio variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 39; y,

b) el dominio variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 40.

3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones de 1 o 2, caracterizado porque dicho anticuerpo no se une a la angiopoyetina 1 (ANG-1) humana.

4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho anticuerpo es del subgrupo IgG4 humano o es del subgrupo IgG1 humano.

5. Una composición farmacéutica caracterizada porque contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3.

6. Uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento destinado a la prevención de metástasis.

7. Uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

8. Uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades vasculares.

9. Un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a la angiopoyetina-2 (ANG-2) humana, caracterizado porque dicho anticuerpo contiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera de acuerdo con la reivindicación 1.

10. Un vector de expresión caracterizado porque contiene un ácido nucleico según la reivindicación 9 para la expresión de un anticuerpo que se une específicamente a la angiopoyetina-2 (ANG-2) humana en una célula hospedante procariota o eucariota.

11. Célula hospedante procariota o eucariota que contiene un vector según la reivindicación 10.

(21) N° de solicitud: 11-058.563A				(51) Int Cl: C07K 16/22	
(22) Fecha de solicitud: 12-05-11				(71) Solicitante(s): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es): BRINKMANN, Ulrich; GRIEP, Remko Albert; KALUZA, Klaus; KAVLIE; Anita; KLEIN, Christian; REGULA, Joerg Thomas y SCHEUER, Werner.	
	08021835.7	16-12-08	EP	(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 16-07-11				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 24-06-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 14-12-09				N° publicación: WO 2010/69532 A1	
No. De solicitud: PCT/EP2009/008930					
(54) Titulo: “ANTICUERPOS CONTRA LA ANGIOPOYETINA 2 HUMANA”					

Resumen.-Reivindicación(es):

Resumen.-

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

Sector: Medicamentos que contienen anticuerpos y actúan como agentes antineoplásicos.

Fig. 1A

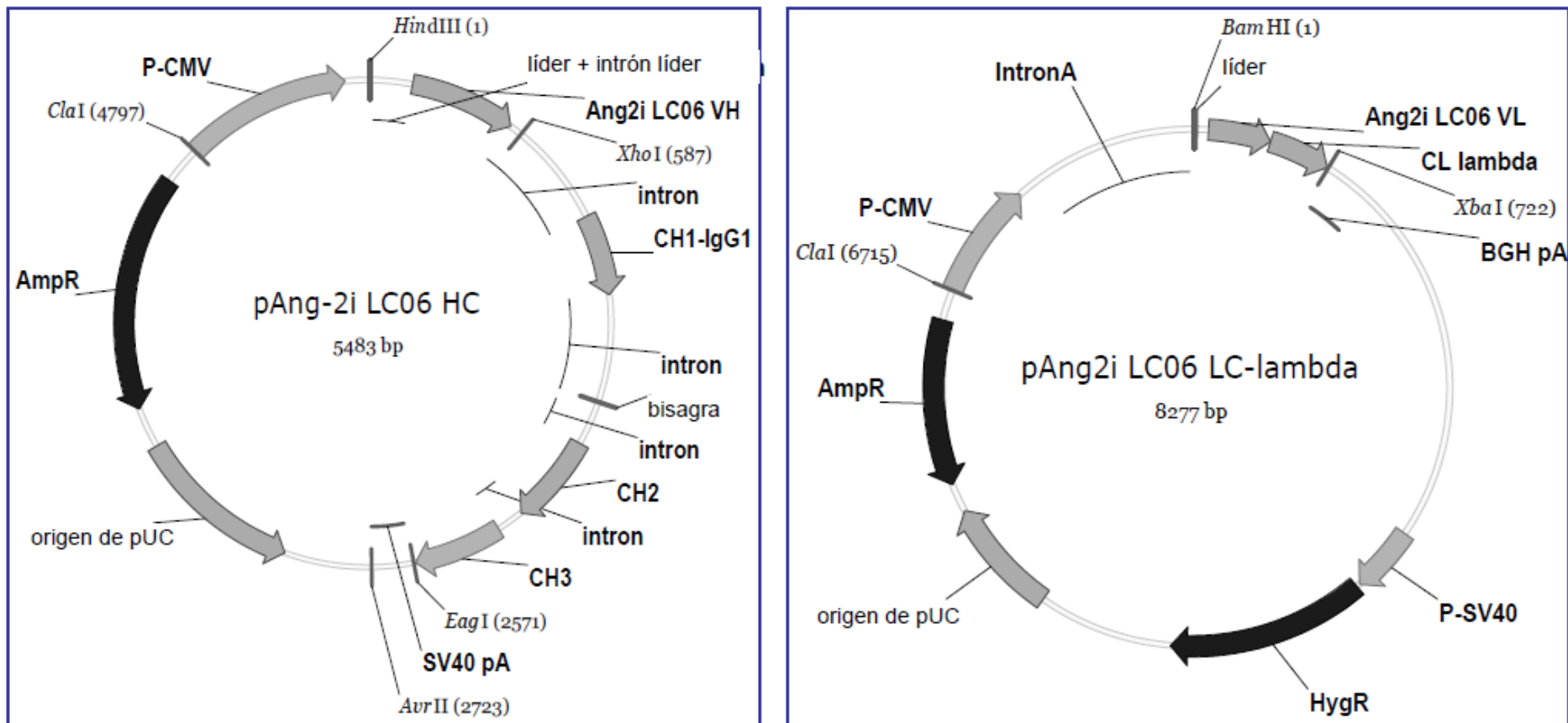


Fig. 1B

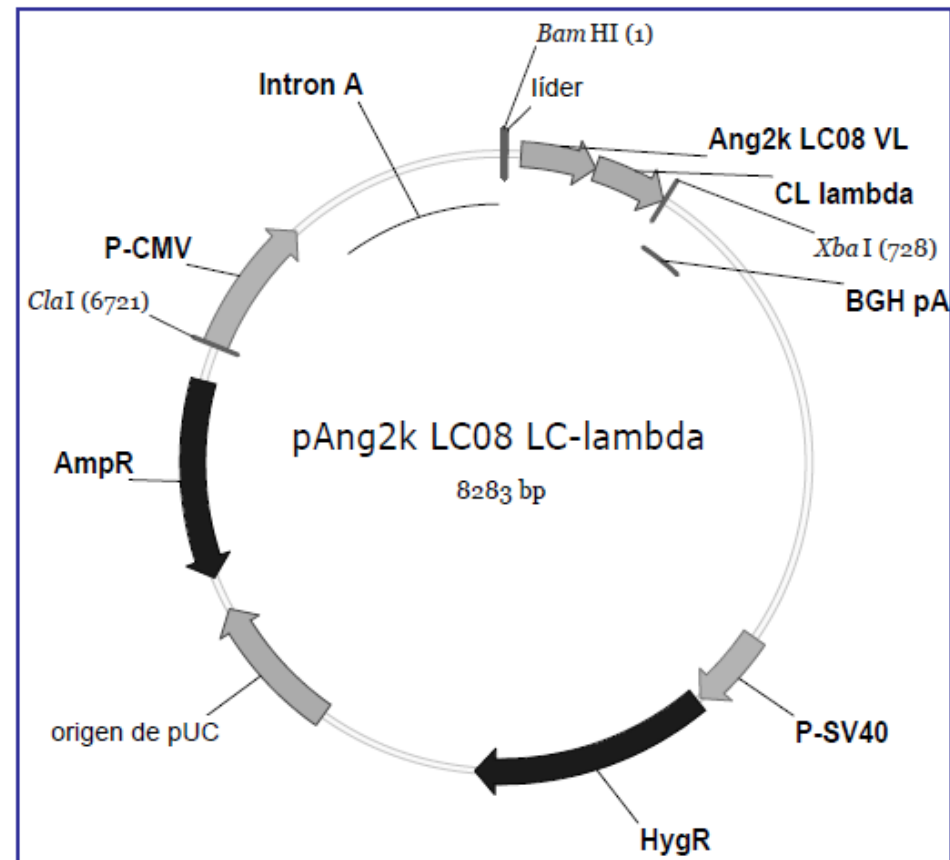
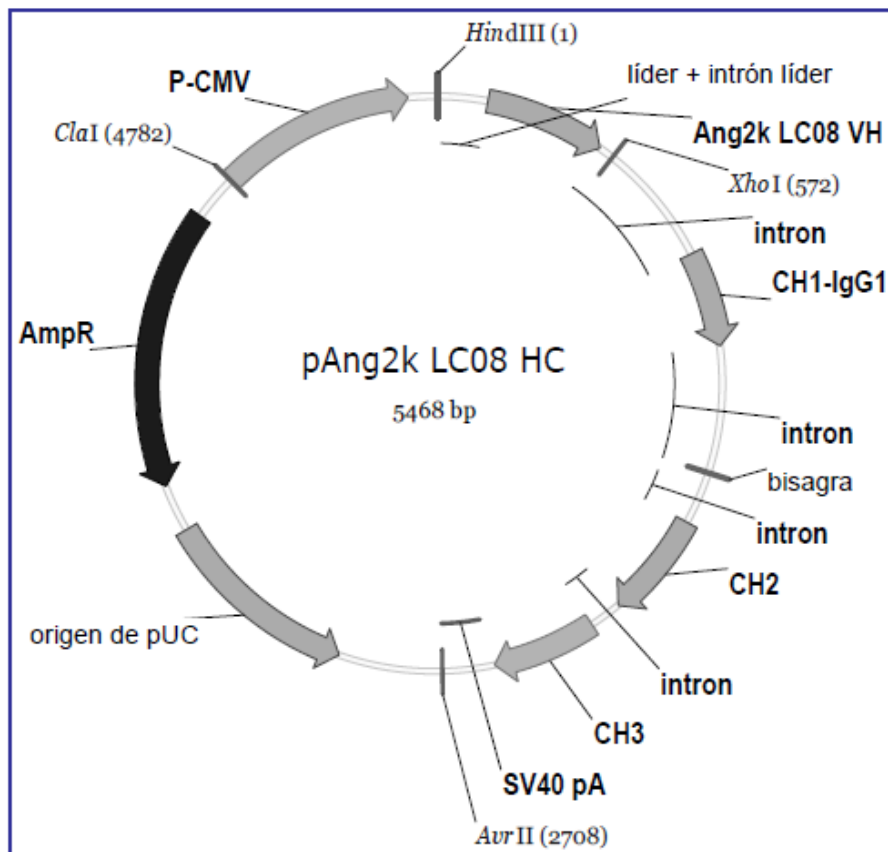


Fig. 2

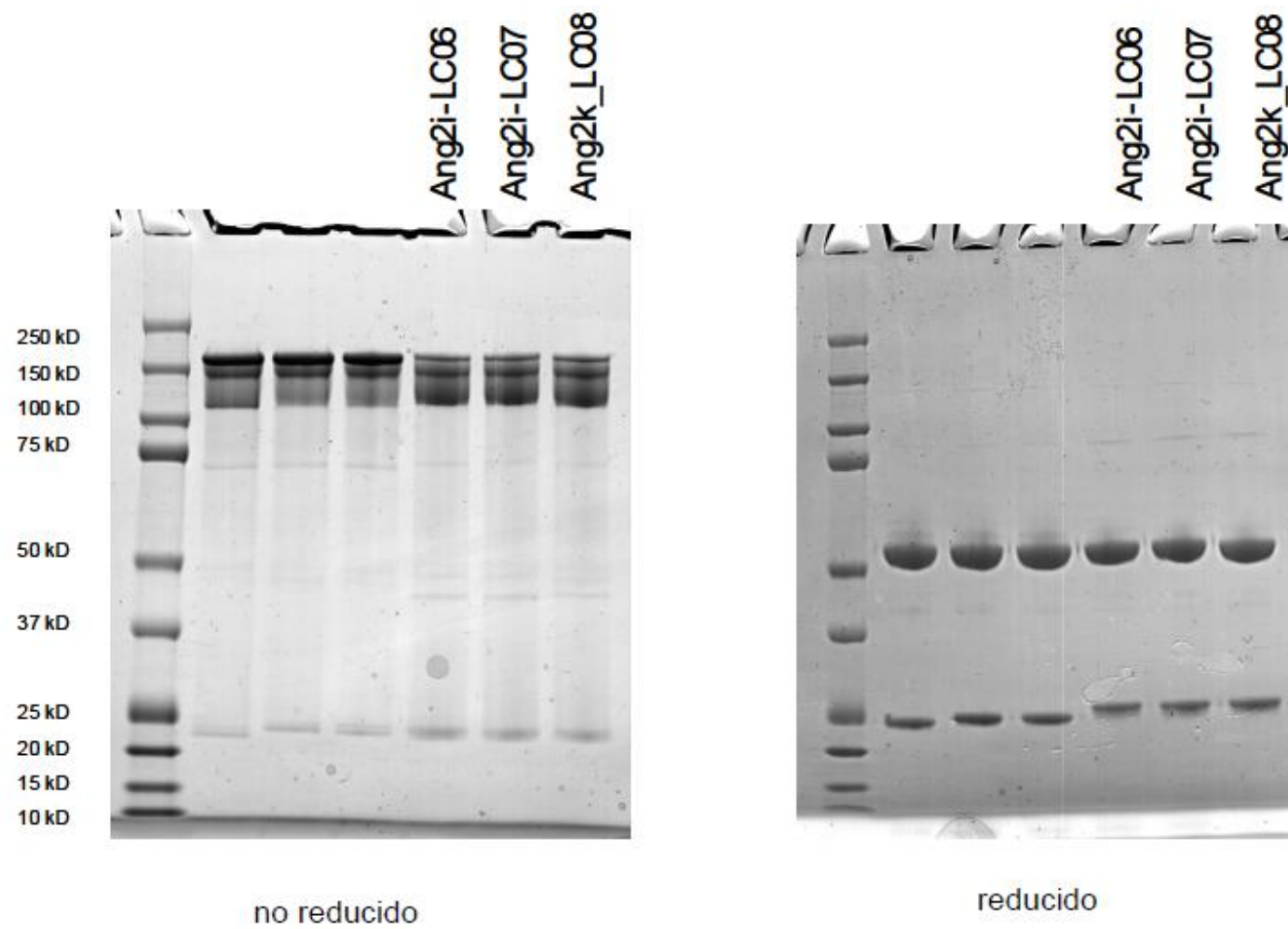


Fig. 3

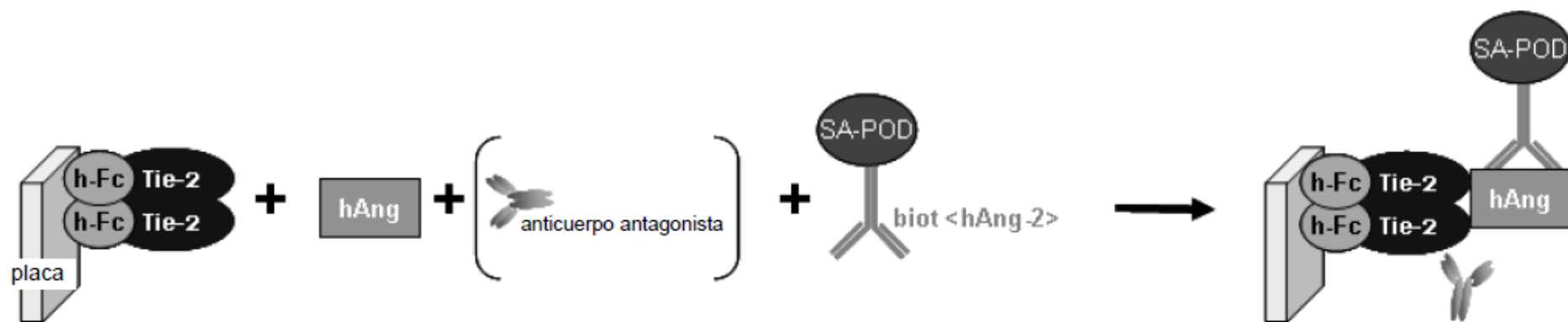


Fig. 4

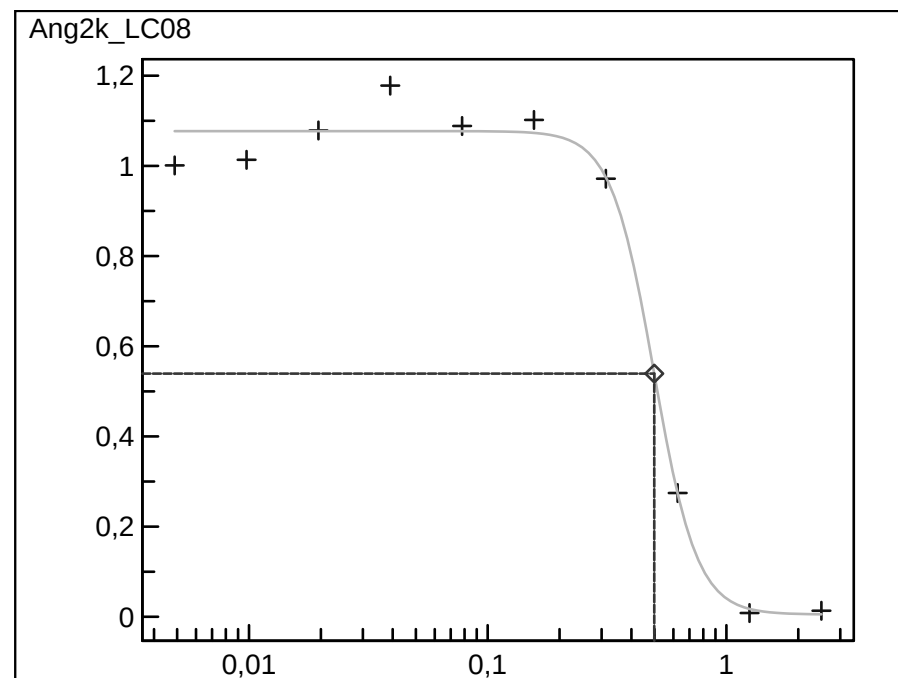
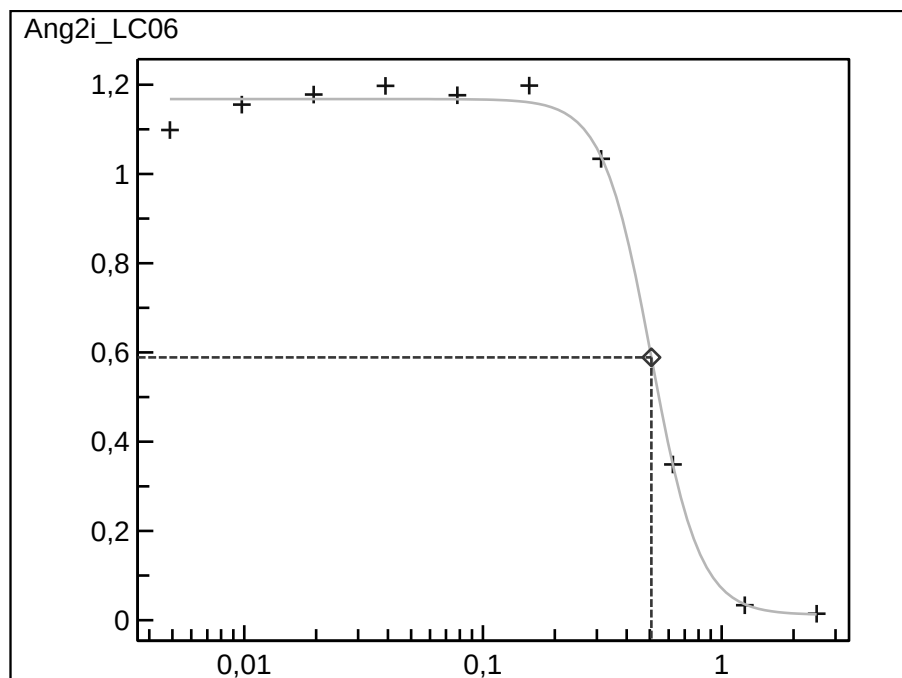


Fig. 5

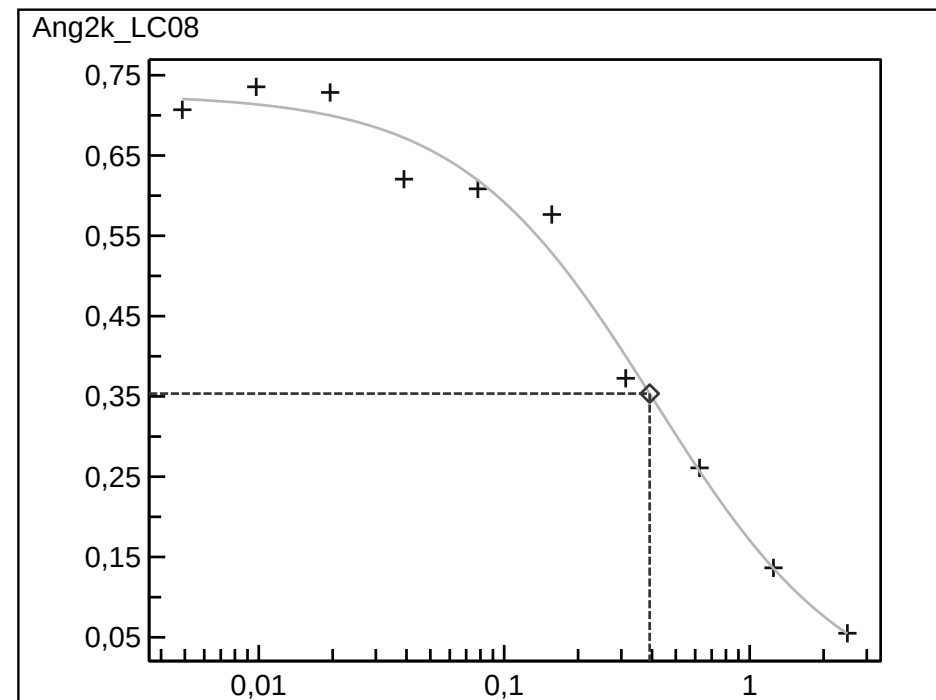
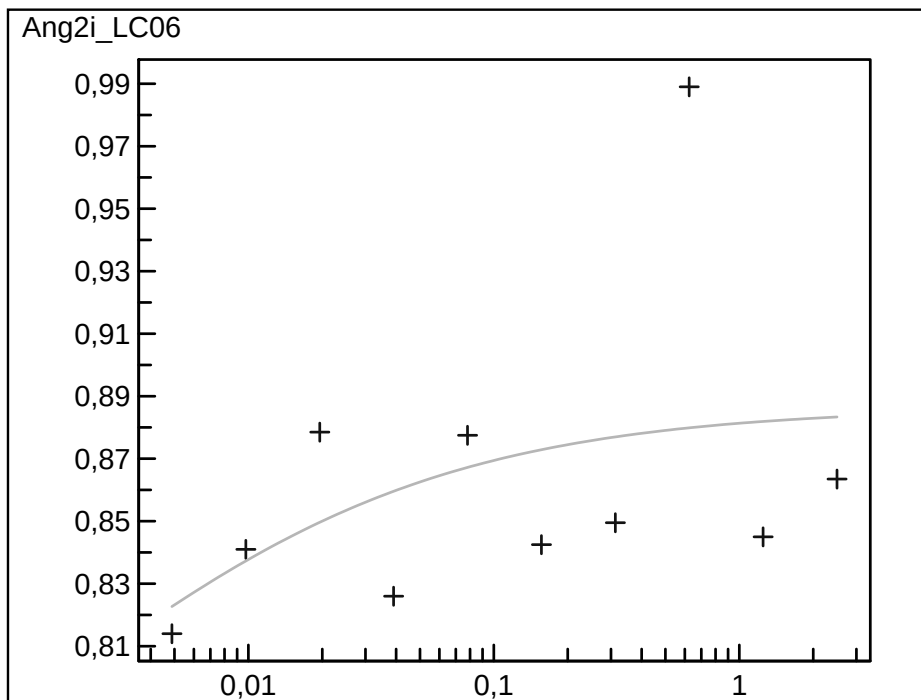


Fig. 6

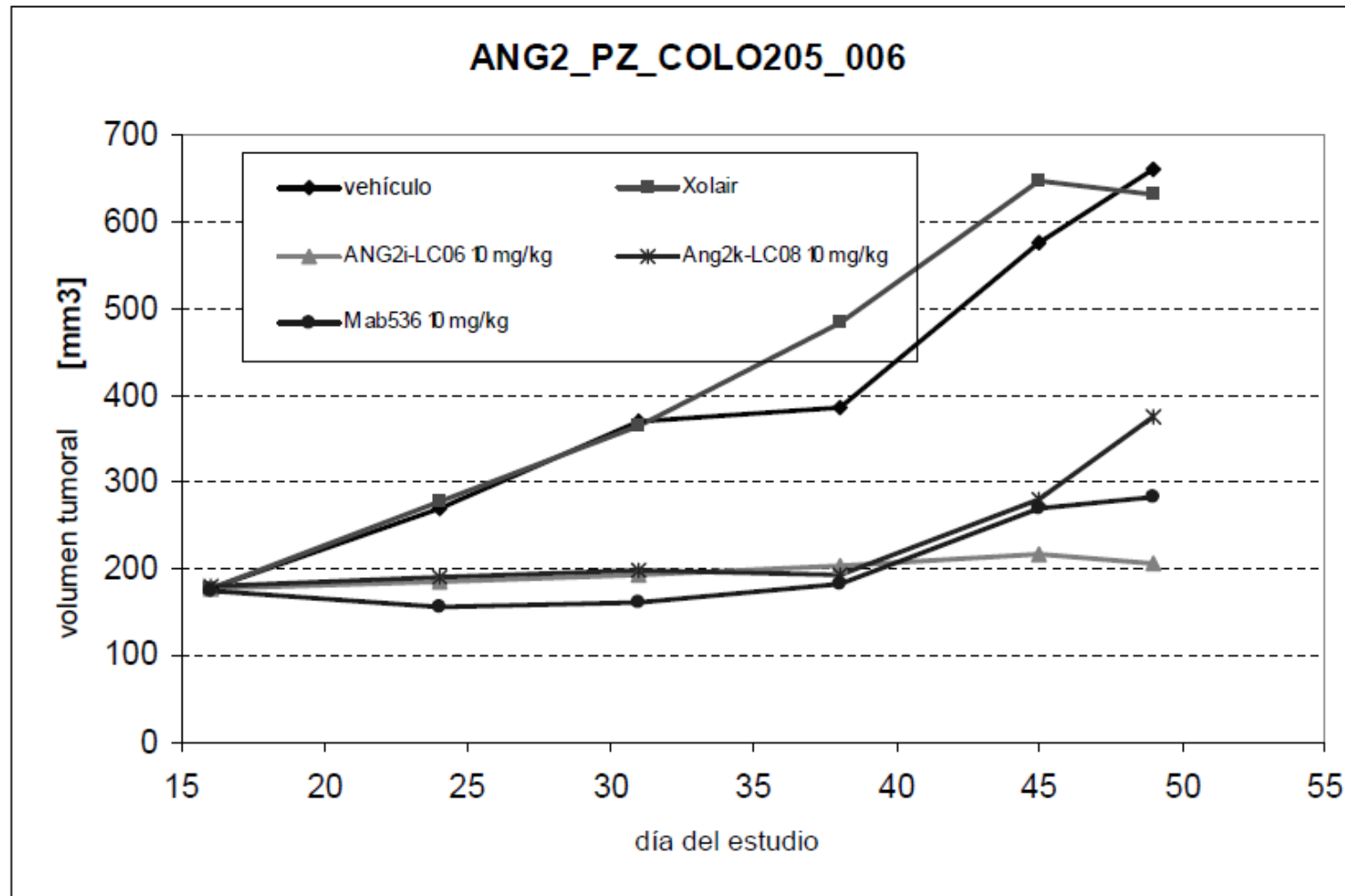


Fig. 7

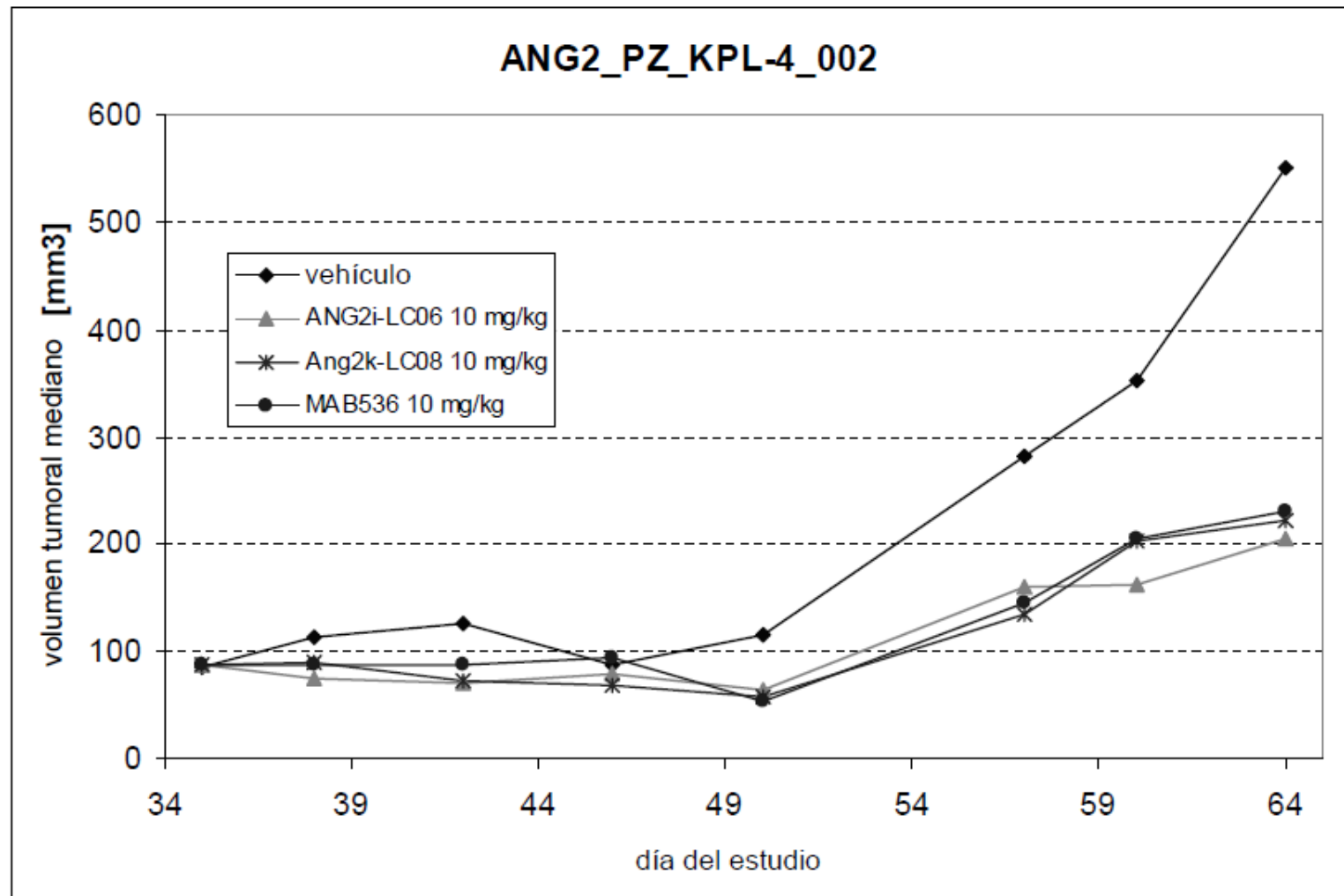


Fig. 8

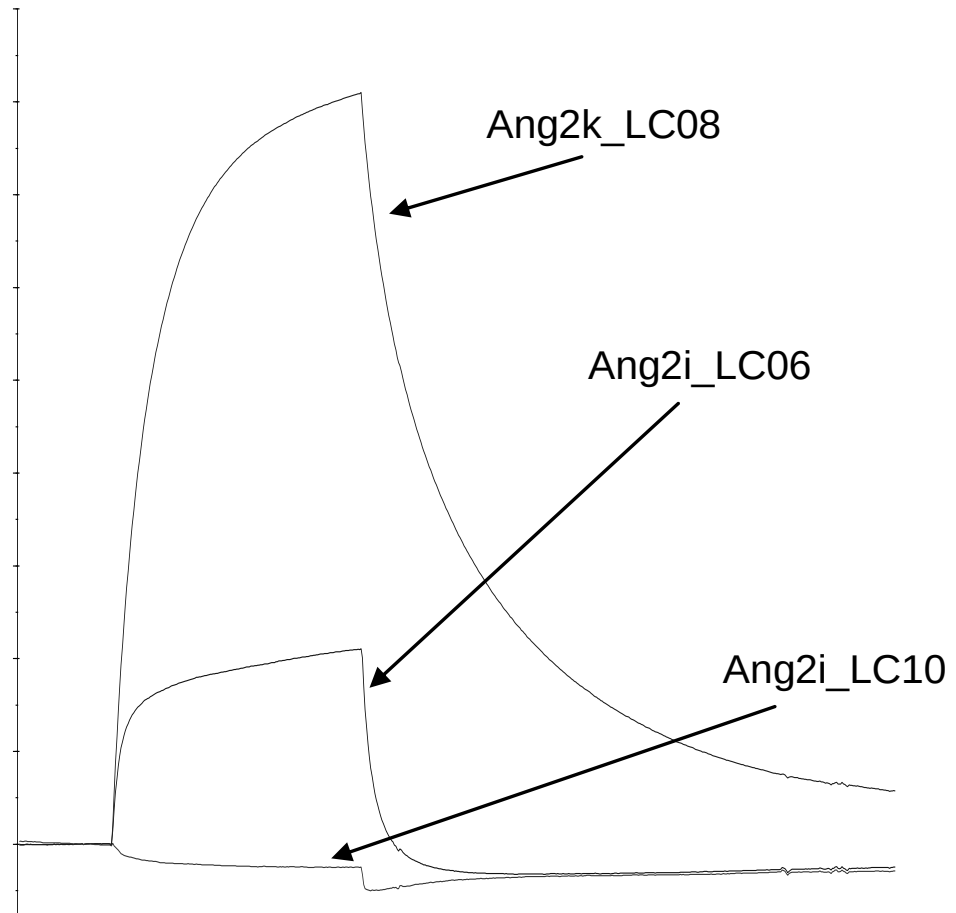


Fig. 9A

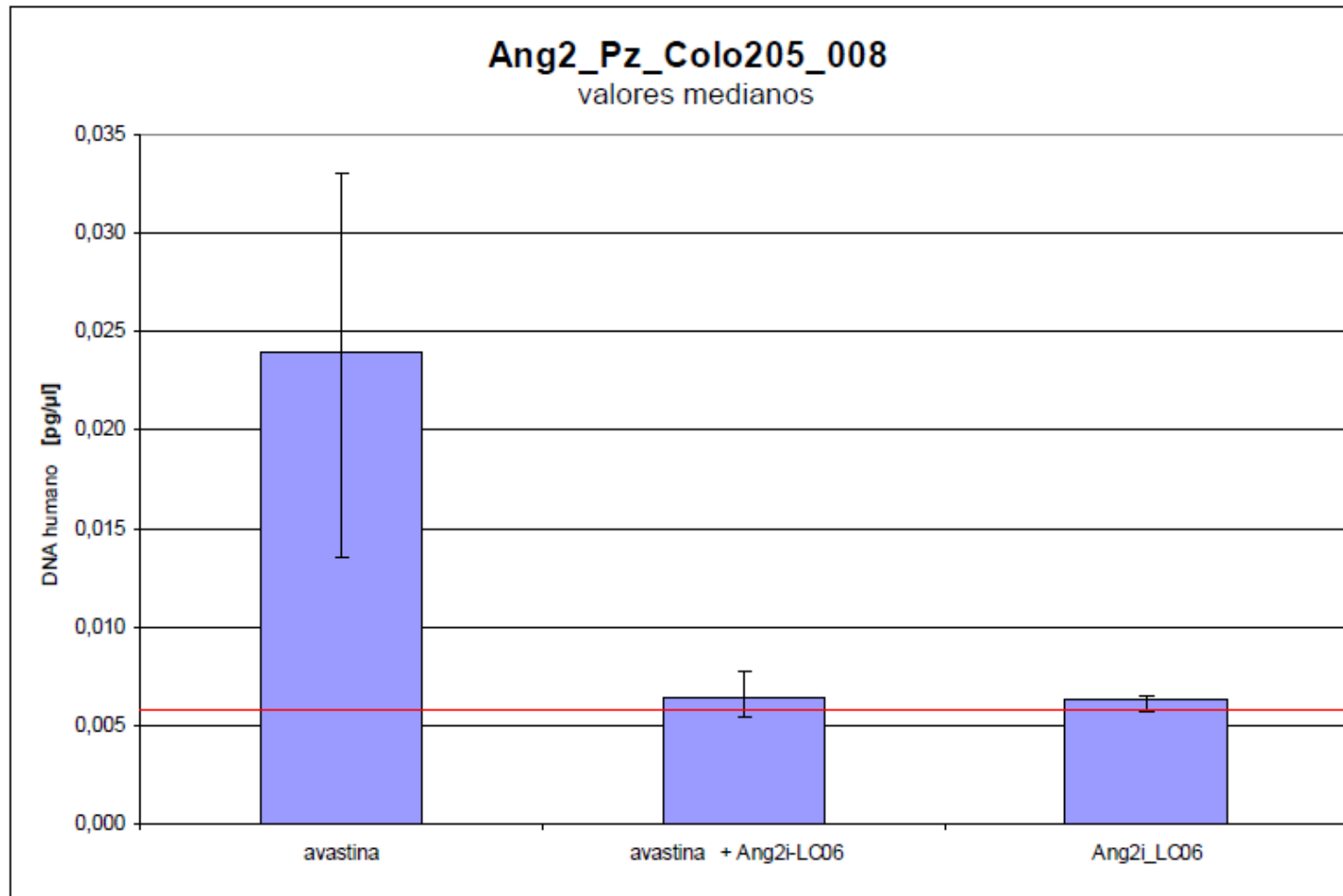


Fig. 9B

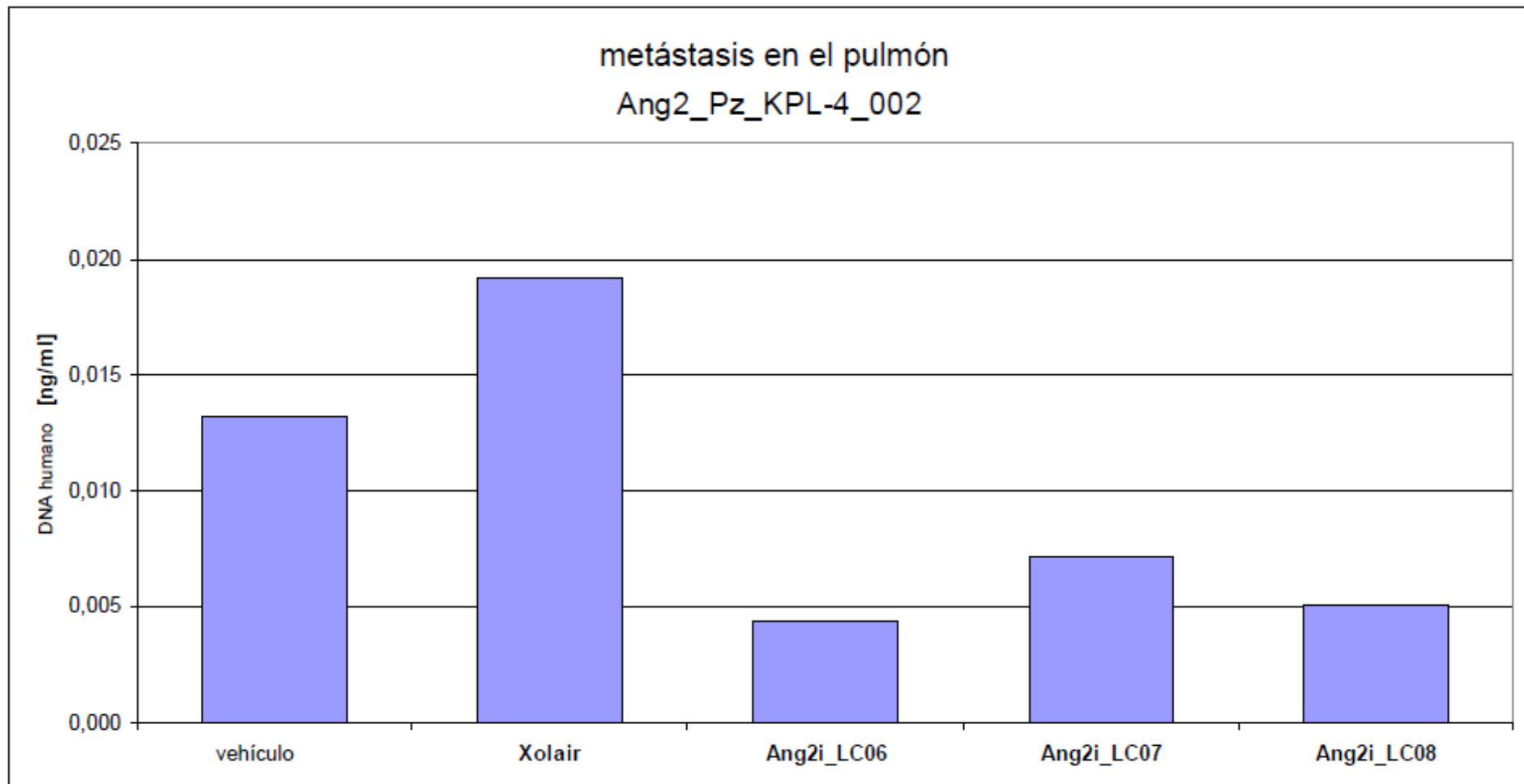


Fig. 10A

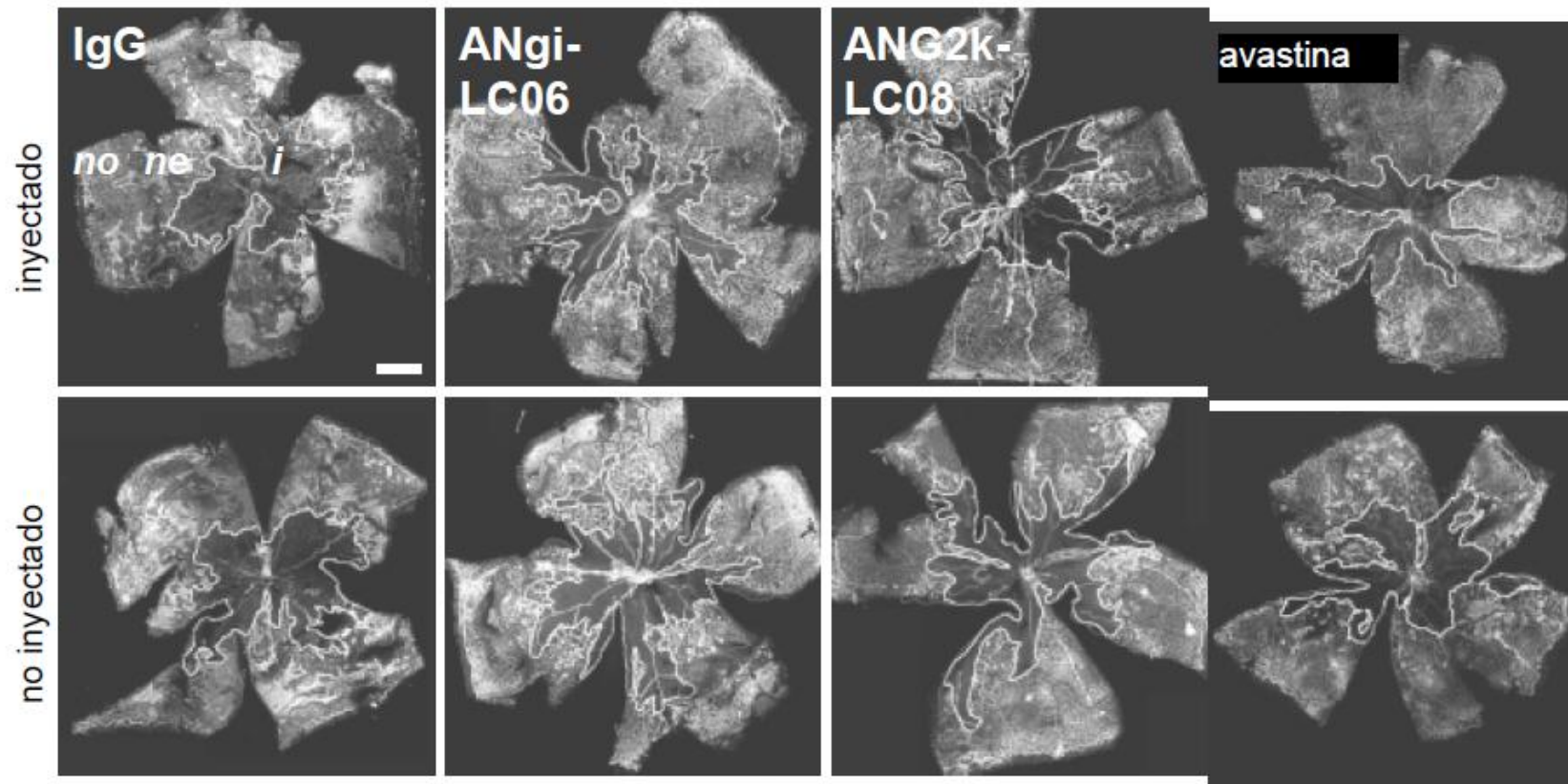
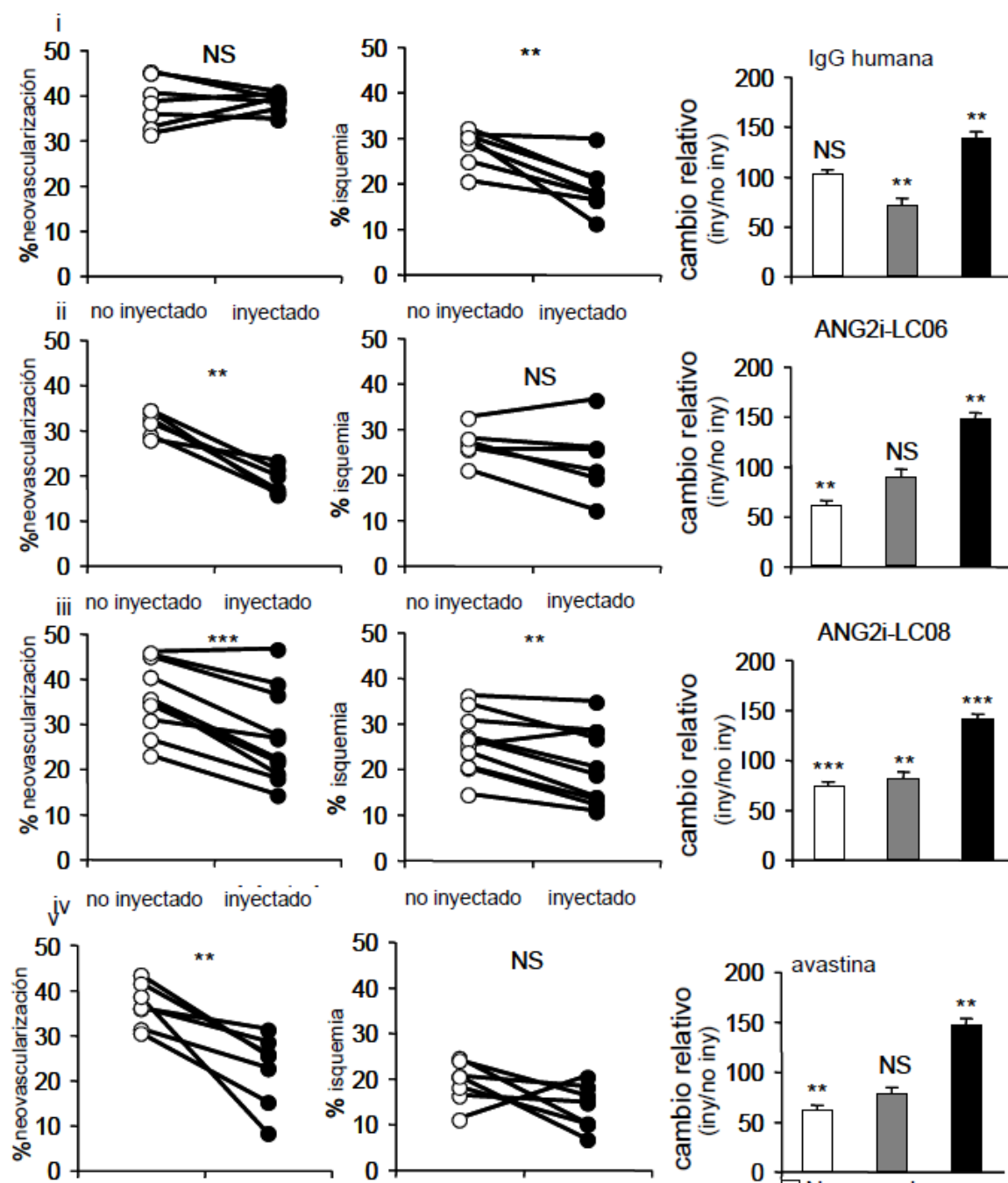


Fig. 10B



TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

Fdo.: firma ilegible

de la ciudad de Basel (Basilea)

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004



Maria Mercedes Uricoechea T.
Maria Mercedes Uricoechea T.
 Traductora Juramentada
 Resolución 10607/81 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET - 3 P 12: 12

258651

Para Uncochea

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

UCS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.





Los abajo firmados, **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en **4070 Basilea, Suiza**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado



The undersigned, **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at **4070 Basel, Switzerland**

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this *17th day of August 2008*.
F. Hoffmann-La Roche AG

Fridolin Klausner
Fridolin Klausner
Holder of procuration

Denise Strebel
Denise Strebel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Suiza
Basilea

{ss

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strebel a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es el titular del poder/mandatario

de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha 19 Junio 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Switzerland

Basel

{ss

On this 17th day of August, 2004, personally Fridolin Klausner and Denise Strebel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of

Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of August, two thousand and four)

Dr. P. Kuster
Notar

17.08.2004

2 Fr.

Dr. PETER KUSTER

Allg. Prot. No. 20

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel



OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by Dr. R.

P. Kuster

3. in his/her function as Att. Noter

4. and certified by the seal of the Gemeinde

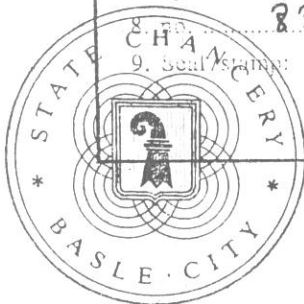
Certified **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Stade) 6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. 8835 / 10 226

9. Seal/Stamp: 10. Signature: B



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO		PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) N° de solicitud: 11-058.563A (51) Clasificación Internacional: C07K 16/22 (71) Solicitante(s): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm	
(72) Inventor(es): BRINKMANN, Ulrich; GRIEP, Remko Albert; KALUZA, Klaus; KAVLIE; Anita; KLEIN, Christian; REGULA, Joerg Thomas y SCHEUER, Werner.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 08021835.7 16-12-08 EP			
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 16-07-11 (86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 14-12-09 No. de solicitud: PCT/EP2009/008930		(87) Publicación internacional: Fecha: 24-06-10 No. Publicación : WO 2010/069532 A1	
(54) Título: “ ANTICUERPOS CONTRA LA ANGIOPOYETINA 2 HUMANA ”			
(57) Resumen.-Reivindicación (es): Resumen.- La presente invención se refiere a anticuerpos contra la angiopoyetina 2 humana (anticuerpos anti-ANG-2), a métodos para su obtención, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y a usos de los mismos. Sector: Medicamentos que contienen anticuerpos y actúan como agentes antineoplásicos.			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS		PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) N° de solicitud: 11-058.563A (51) Clasificación Internacional: C07K 16/22 (71) Solicitante(s): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG		(22) Fecha de solicitud: 12-05-11	
(72) Inventor(es): BRINKMANN, Ulrich; GRIEP, Remko Albert; KALUZA, Klaus; KAVLIE; Anita; KLEIN, Christian; REGULA, Joerg Thomas y SCHEUER, Werner.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 08021835.7 16-12-08 EP			
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 16-07-11 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 14-12-09 No. de solicitud: PCT/EP2009/008930		(87) Publicación internacional Fecha: 24-06-10 N° publicación: WO 2010/069532 A1	
(54) Título: “ ANTICUERPOS CONTRA LA ANGIOPOYETINA 2 HUMANA ”			

Anticuerpos contra la angiopoyetina 2 humana

Resumen-Objeto y Finalidad de la invención

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

Sector: Medicamentos que contienen anticuerpos y actúan como agentes antineoplásicos.

Anticuerpos contra la angiopoyetina 2 humana

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

Antecedentes de la invención

La angiogénesis está implicada en la patogénesis de muchos trastornos que incluyen los tumores sólidos, síndromes neovasculares intraoculares, por ejemplo las retinopatías proliferativas o degeneración macular debida a la edad (AMD), artritis reumatoide y psoriasis (Folkman, J. y col., J. Biol. Chem. 267, 10931-10934, 1992; Klagsbrun, M. y col., Annu. Rev. Physiol. 53, 217-239, 1991; y Garner, A., Enfermedades vasculares, en: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A. y Klintworth, G.K. (coord.), 2ª edición, Marcel Dekker, Nueva York 1994, pp. 1625-1710). En el caso de los tumores sólidos, la neovascularización permite que las células tumorales adquieran ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa, si se comparan con las células normales. Por consiguiente, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en las secciones tumorales y la supervivencia de las pacientes de cáncer de mama así como en varios tumores más (Weidner, N. y col., N. Engl. J. Med. 324, 1-8, 1991; Horak, E.R. y col., Lancet 340, 1120-1124, 1992; y Macchiarini, P. y col., Lancet 340, 145-146, 1992).

ANG-2 y anticuerpos anti-ANG-2

La angiopoyetina-2 humana (ANG-2) (también abreviada con ANGPT2 o ANG2) (SEQ ID NO: 107) se ha descrito en Maison-

pierre, P.C. y col., Science 277, 55-60, 1997 y Cheung, A.H. y col., Genomics 48, 389-91, 1998. Las angiopoyetinas-1 y -2 (ANG-1 (SEQ ID NO: 108) y ANG-2 (SEQ ID NO: 107)) se descubrieron como ligandos de las Ties, un grupo de tirosina-
5 quinasas que se expresa selectivamente dentro del endotelio vascular, ver Yancopoulos, G.D. y col., Nature 407, 242-48, 2000. Hay cuatro componentes definitivos del grupo de la angiopoyetina. La angiopoyetina-3 y la -4 (Ang-3 y Ang-4) pueden representar oponentes muy divergentes del mismo lugar
10 genético del ratón y del hombre, ver Kim, I. y col., FEBS Lett. 443, 353-56, 1999; Kim, I. y col., J. Biol. Chem. 274, 26523-28, 1999. La ANG-1 y la ANG-2 se identificaron inicialmente en ensayos de cultivo de tejido como agonista y antagonista, respectivamente (véase en cuanto a la ANG-1: Davies,
15 S. y col., Cell 87, 1161-69, 1996; y en cuanto a la ANG-2: Maisonpierre, P.C. y col., Science 277, 55-60, 1997). Todas las angiopoyetinas conocidas se unen primariamente a la Tie2 y tanto la Ang-1 y como la -2 se unen a la Tie2 con una afinidad de 3 nM (Kd), ver Maisonpierre, P.C. y col., Science
20 277, 55-60, 1997. Se ha constatado que la Ang-1 apoya la supervivencia EC y favorece la integridad endotelial, ver Davis, S. y col., Cell 87, 1161-69, 1996; Kwak, H.J. y col., FEBS Lett. 448, 249-53, 1999; Suri, C. y col., Science 282, 468-71, 1998; Thurston, G. y col., Science 286, 251 1-14,
25 1999; Thurston, G. y col., Nat. Med. 6, 460-63, 2000, mientras que la ANG-2 tiene el efecto opuesto y favorece la desestabilización y la regresión de los vasos sanguíneos en ausencia de los factores de supervivencia VEGF o del factor

de crecimiento de fibroblastos básico, ver Maisonpierre, P.C. y col., Science 277, 55-60, 1997. Sin embargo, muchos estudios de la función de la ANG-2 sugieren un panorama más complejo. Es posible que la ANG-2 sea un regulador complejo de la remodelación vascular que desempeña un papel tanto en la ramificación vascular como en la regresión vascular. En confirmación de estos roles de la ANG-2, los análisis de expresión revelan que la ANG-2 se induce rápidamente, junto con el VEGF, en los inicios de la ramificación angiogénica en los adultos, mientras que la ANG-2 se induce en ausencia del VEGF en los inicios de la regresión vascular, ver Holash, J. y col., Science 284, 1994-98, 1999; Holash, J. y col., Oncogene 18, 5356-62, 1999. Consistente con un rol dependiente de contexto, la ANG-2 se une específicamente al mismo receptor endotelial específico, la Tie-2, que se activa con la Ang-1, pero que tiene efectos dependientes del contexto en su activación, ver Maisonpierre, P.C. y col., Science 277, 55-60, 1997.

Los ensayos de angiogénesis corneal han puesto de manifiesto que tanto la ANG-1 como la ANG-2 tienen efectos similares, que actúan de forma sinérgica con el VEGF para favorecer el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, ver Asahara, T. y col., Circ. Res. 83, 233-40, 1998. La posibilidad de que haya una respuesta endotelial dependiente de la dosis surge de la observación de que "in vitro" en una concentración alta, la ANG-2 puede ser también pro-angiogénica, Kim, I. y col., Oncogene 19, 4549-52, 2000. En una concentración elevada, la ANG-2 actúa como factor de supervivencia de apóp-

tosis de las células endoteliales durante la apoptosis de privación en suero por activación de la Tie2 a través del mecanismos de la quinas PI-3 y Akt, ver Kim, I. y col., Oncogene 19, 4549-52, 2000.

5 Otros ensayos "in vitro" sugieren que durante una exposición persistente, los efectos de la ANG-2 pueden derivar progresivamente de antagonista a agonista de la Tie2 y en puntos temporales posteriores, puede contribuir directamente a la formación de tubos vasculares y a la estabilización de
10 los nuevos vasos, ver Teichert-Kuliszewska, K. y col., Cardiovasc. Res. 49, 659-70, 2001. Además, si las EC se cultivan en un gel de fibrina, se observa también la activación de la Tie2 con la ANG-2, lo cual sugiere que tal vez la acción de la ANG-2 depende del estado de diferenciación de la EC, ver
15 Teichert-Kuliszewska, K. y col., Cardiovasc. Res. 49, 659-70, 2001. En las EC microvasculares en cultivo en un gel de colágeno tridimensional, la ANG-2 puede inducir también la activación de la Tie2 y favorecer la formación de estructuras de tipo capilar, ver Mochizuki, Y. y col., J. Cell. Sci. 115,
20 175-83, 2002. El uso de un cultivo simultáneo esférico de 3-D como modelo "in vitro" de maduración vascular demuestra que el contacto directo entre las EC y las células mesenquimales reduce la capacidad de respuesta al VEGF, mientras que la presencia del VEGF y la ANG-2 induce la ramificación, ver
25 Korff, T. y col., Faseb J. 15, 447-57, 2001. Etoh, T.H. y col. han demostrado que en las EC que expresan constitutivamente la Tie2, la expresión de las MMP-1, -9 y u-PA se incrementa en gran manera con la ANG-2 en presencia del VEGF,

ver Etoh, T. y col., Cancer Res. 61, 2145-53, 2001. Con un modelo de membrana de pupila "in vivo", Lobov, I.B. y col. han demostrado que la ANG-2 en presencia del VEGF endógeno favorece el rápido aumento del diámetro capilar, remodelando la lámina basal, la proliferación y migración de células endoteliales y estimula la ramificación de nuevos vasos sanguíneos, ver Lobov, I.B. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 11205-10, 2002. En cambio, la ANG-2 favorece la muerte de las células endoteliales y la regresión vascular sin VEGF endógeno, ver Lobov, I.B. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 11205-10, 2002. De modo similar, con un modelo tumoral "in vivo", Vajkoczy, P. y col. han demostrado que los agregados multicelulares inician el crecimiento vascular por ramificación angiogénica mediante la expresión simultánea del VEGFR-2 y de la ANG-2 en el hospedante y en el endotelio tumoral, Vajkoczy, P. y col., J. Clin. Invest. 109, 777-85, 2002. Este modelo ilustra que la microvasculatura establecida de tumores en crecimiento se caracteriza por una remodelación constante, mediada putativamente por la expresión del VEGF y de la ANG-2, ver Vajkoczy, P. y col., J. Clin. Invest. 109, 777-85, 2002.

Los estudios en ratones "knock-out" de Tie-2 y angiopoyetina-1 indican fenotipos similares y sugieren que la fosforilación de la Tie-2 estimulada por la angiopoyetina-1 media en la remodelación y estabilización del vaso en desarrollo, favoreciendo la maduración del vaso sanguíneo durante la angiogénesis y el mantenimiento de la adhesión entre la célula y el soporte endotelial de la misma (Dumont, J. y

col., Genes & Development 8, 1897-1909, 1994; Sato, T.N., Nature 376, 70-74, 1995; (Thurston, G. y col., Nature Medicine: 6, 460-463, 2000). Se cree que el rol de la angiopoyetina-1 se conserva en el adulto, en el que se
5 expresa de modo amplio y constitutivo (Hanahan, D., Science 277, 48-50, 1997; Zagzag, D. y col., Exp. Neurology 159, 391-400, 1999). En cambio, la expresión de la angiopoyetina-2 se limita primariamente a los sitios de remodelación vascular, en los que se cree que bloquea la estabilización constitutiva
10 o la función de maduración de la angiopoyetina-1, permitiendo que los vasos vuelvan a o permanezcan en un estado plástico, que puede ser una causa mayor de las señales de ramificación (Hanahan, D., 1997; Holash, J. y col., Orzcogerze 18, 5356-62, 1999; Maisonpierre, P.C., 1997). Los estudios de expre-
15 sión de la angiopoyetina-2 en la angiogénesis patológica han demostrado la existencia de muchos tipos de tumores que presentan expresión vascular de la angiopoyetina-2 (Maisonpierre, P.C. y col., Science 277, 55-60, 1997). Los estudios funcionales sugieren que la angiopoyetina-2 interviene en la
20 angiogénesis tumoral y está asociada con la sobreexpresión de la angiopoyetina-2 con incremento del crecimiento tumoral en un modelo de injerto ajeno (xenograft) en ratón (Ahmad, S.A. y col., Cancer Res. 61, 1255-1259, 2001). Otros estudios han asociado la sobreexpresión de la angiopoyetina-2 con la
25 hipervascularización tumoral (Etoh, T. y col., Cancer Res. 61, 2145-53, 2001; Tanaka, F. y col., Cancer Res. 62, 124-29, 2002).

En los años recientes se han propuesto la angiopoyetina-1, la angiopoyetina-2 y/o la Tie-2 como posibles dianas para la terapia anti-cancerosa. Por ejemplo, en US 6,166,185, US 5,650,490 y US 5,814,464 se describen en cada caso anticuerpos ligando y receptor anti-Tie-2. En los estudios que emplean la Tie-2 soluble se describe que esta disminuye el número y el tamaño de los tumores en roedores (Lin, 1997; Lin 1998). Siemeister, G. y col., Cancer Res. 59, 3185-91, 1999, han generado líneas celulares de melanoma humano que expresan el dominio extracelular de la Tie-2, las han inyectado a ratones sin pelo y han publicado que la Tie-2 soluble produce una inhibición significativa del crecimiento tumoral y de la angiogénesis tumoral. Dado que tanto la angiopoyetina-1 como la angiopoyetina-2 se fijan sobre la Tie-2, no queda claro en estos estudios si la angiopoyetina-1, la angiopoyetina-2 o la Tie-2 podrían ser dianas atractivas para una terapia anti-cancerosa. Sin embargo, se cree que una terapia eficaz anti-angiopoyetina-2 sería beneficiosa para tratar enfermedades tales como el cáncer, cuya progresión depende de la angiogénesis aberrante, en ellas el bloqueo del proceso podría conducir a la prevención del progreso de la enfermedad (Folkman, J., Nature Medicine 1, 27-31, 1995).

Además, algunos grupos han publicado artículos sobre el uso de anticuerpos y péptidos que se fijan sobre la angiopoyetina-2, véase, por ejemplo, US 6,166,185 y US 2003/10124129; WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 03/057134 o US 2006/0122370.

En el estudio de la expresión focal de la angiopoyetina-2 se ha demostrado que antagonizando la señal de la angiopoyetina-1/Tie-2 se afloja la estructura vascular cerrada, exponiendo las EC a las señales de activación de los inductores de la angiogénesis, p.ej. del VEGF (Hanahan, 1997). Este efecto pro-angiogénico resultante de la inhibición de la angiopoyetina-1 indica que la terapia anti-angiopoyetina-1 no sería un tratamiento anti-canceroso eficaz.

La ANG-2 se expresa durante el desarrollo en sitios, en los que tiene lugar una remodelación de los vasos sanguíneos, véase Maisonpierre, P.C. y col., *Science* 277, 55-60, 1997. En los individuos adultos, la expresión de la ANG-2 se restringe a los sitios de remodelación vascular así como a los tumores muy vascularizados, incluidos el glioma (Osada, H. y col., *Int. J. Oncol.* 18, 305-09, 2001; Koga, K. y col., *Cancer Res.* 61, 6248-54, 2001), el carcinoma hepatocelular (Tanaka, S. y col., *J. Clin. Invest.* 103, 341-45, 1999), el carcinoma gástrico (Etoh, T. y col., *Cancer Res.* 61, 2145-53, 2001; Lee, J.H. y col., *Int. J. Oncol.* 18, 355-61, 2001), el tumor de tiroides (Bunone, G. y col., *Am. J. Pathol.* 155, 1967-76, 1999), el cáncer de pulmón no de células pequeñas (Wong, M.P. y col., *Lung Cancer* 29, 11-22, 2000), el cáncer de colon (Ahmad, S.A. y col., *Cancer* 92, 1138-43, 2001) y el cáncer de próstata (Wurmbach, J.H. y col., *Anticancer Res.* 20, 5217-20, 2000). Se ha observado que algunas células tumorales expresan la ANG-2. Por ejemplo, Tanaka, S. y col., *J. Clin. Invest.* 103, 341-45, 1999, han detectado el mRNA de la ANG-2 en 10 de 12 muestras de carcinoma hepatocelular humano (HCC). El grupo

de Ellis ha publicado que la ANG-2 se expresa de forma omnipresente en el epitelio tumoral, ver Ahmad, S.A. y col., Cancer 92, 1138-43, 2001. Otros investigadores han obtenido resultados similares, ver Chen, L. y col., J. Tongji Med. Univ. 21, 228-35, 2001. Cuando detectaban los niveles de mRNA de la ANG-2 en muestras archivadas de cáncer de mama humano, Sfiligoi, C. y col., Int. J. Cancer 103, 466-74, 2003, encontraron que el mRNA de la ANG-2 está asociado de modo significativo con la invasión de nódulos linfáticos auxiliares, con períodos de tiempo cortos sin enfermedad e intervalos cortos de supervivencia global, ver Tanaka, F. y col., Cancer Res. 62, 7124-29, 2002, que revisaron un total de 236 pacientes de cáncer de pulmón no de células pequeñas (NSCLC) con estadios patológicos de I a IIIA, respectivamente. Aplicando la inmunohistoquímica encontraron que el 16,9% de los pacientes de NSCLC son positivos de la ANG-2. La densidad de los microvasos en el tumor positivo de ANG-2 es significativamente mayor que en el caso de los tumores negativos de ANG-2. Este efecto angiogénico de la ANG-2 se observa únicamente cuando la expresión del VEGF es elevada. Es más, la expresión positiva de la ANG-2 es un factor significativo para predecir una corta supervivencia postoperatoria, ver Tanaka, F. y col., Cancer Res. 62, 7124-29, 2002. Sin embargo no encontraron una correlación significativa entre la expresión de la Ang-1 y la densidad de los microvasos, ver Tanaka, F. y col., Cancer Res. 62, 7124-29, 2002. Estos resultados sugieren que la ANG-2 es un indicador de pacientes de pronóstico "pobre" de varios tipos de cáncer.

En fechas recientes, aplicando un modelo de ratón "knock-out" de ANG-2, el grupo de Yancopoulos ha publicado que la ANG-2 se requiere para la angiogénesis postnatal, Gale, N.W. y col., Dev. Cell 3, 411-23, 2002. Han demostrado
5 que la regresión programada para el desarrollo de la vasculatura hialoide del ojo no se produce en los ratones "knockout" de la ANG-2 y los vasos sanguíneos de sus retinas no consiguen ramificarse a partir de la arteria central de la retina, Gale, N.W. y col., Dev. Cell 3, 411-23, 2002. Han descubierto
10 además que la delección de la ANG-2 se traduce en defectos profundos de modelado y de funcionamiento de la vasculatura linfática, ver Gale, N.W. y col., Dev. Cell 3, 411-23, 2002. El rescate genético con la Ang-1 corrige los defectos linfáticos, pero no los de la angiogénesis, ver Gale, N.W. y col.,
15 Dev. Cell 3, 411-23, 2002.

Peters y sus colegas han publicado que la Tie2 soluble, cuando se libera en forma de proteína recombinante o en un vector de expresión vírico, inhibe "in vivo" el crecimiento del carcinoma de mama murino y del melanoma en modelos con
20 ratones, Lin, P. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8829-34, 1998; Lin, P. y col., J. Clin. Invest. 100, 2072-78, 1997. Las densidades vasculares de los tejidos así tratados se reducen en gran manera. Además, la angiogénesis bloqueada con Tie2 soluble en la córnea de rata estimulada con medio
25 acondicionado con células tumorales, ver Lin, P. y col., J. Clin. Invest. 100, 2072-78, 1997. Además, Isner y su equipo han demostrado que la adición de la ANG-2 al VEGF favorece de modo significativo una neovascularización circunferencial

mayor y más prolongada que el VEGF solo, ver Asahara, T. y col., Circ. Res. 83, 233-40, 1998. El exceso de receptor de Tie2 soluble impide la modulación de la neovascularización inducida por el VEGF causada por la ANG-2, ver Asahara, T. y col., Circ. Res. 83, 233-40, 1998. Siemeister, G. y col., Cancer Res. 59, 3185-91, 1999, han demostrado con injertos ajenos a ratón sin pelo que la sobreexpresión de los dominios extracelulares de fijación sobre ligando de la Flt-1 o de la Tie2 en los injertos ajenos se traduce en una inhibición significativa del mecanismo que no puede compensarse con el otro, lo cual sugiere que el mecanismo del receptor del VEGF y el mecanismo de la Tie2 deberían considerarse como dos mediadores independientes, esenciales para el proceso de la angiogénesis "in vivo", ver Siemeister, G. y col., Cancer Res. 59;3, 3185-91, 1999. Esto se ha confirmado en una publicación más reciente de White, R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 5028-33, 2003. En su estudio se ha demostrado que un aptámero de RNA resistente a la nucleasa, que se une específicamente e inhibe a la ANG-2, inhibe de modo significativo la neovascularización inducida por el bFGF en el modelo de angiogénesis en la microbolsa de la córnea de la rata.

Resumen de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a la angiopoyetina-2 humana (ANG-2), caracterizado porque como región CDR3 de dominio variable de cadena larga contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 49.

El anticuerpo se caracteriza con preferencia porque:

- a) el dominio variable de cadena larga contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 42, o SEQ ID NO: 50, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43, o SEQ ID NO: 51 y
- b) el dominio variable de cadena corta contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 44, o SEQ ID NO: 52, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 45, o SEQ ID NO: 53, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46, o SEQ ID NO: 54.

El anticuerpo se caracteriza con preferencia porque contiene:

- a) el dominio variable de cadena larga de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, o SEQ ID NO: 55; y
- b) el dominio variable de cadena corta de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, o SEQ ID NO: 56.

El anticuerpo se caracteriza con preferencia porque dicho anticuerpo no se une específicamente a la angiopoyetina 1 (ANG-1).

Otra forma de ejecución de la invención consiste en una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención.

Otra forma de ejecución de la invención es el uso de un
5 anticuerpo según la invención para la fabricación de una composición farmacéutica.

Otra forma de ejecución de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para la prevención de metástasis.

10 Otra forma de ejecución de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para el tratamiento del cáncer.

Otra forma de ejecución de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para el tratamiento de enfermedades vasculares.

15 Otra forma de ejecución de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para el tratamiento de la retinopatía.

Otra forma de ejecución de la invención es un ácido nucleico que codifica al dominio variable de cadena larga y/o
20 al dominio variable de cadena corta de un anticuerpo según la invención.

La invención proporciona además vectores de expresión que contienen ácido nucleico según la invención capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula hospedante proca-
25 riota o eucariota y las células hospedantes que contienen dichos vectores para la producción recombinante de un anticuerpo de este tipo.

La invención se refiere además a una célula hospedante procariota o eucariota que contiene un vector según la invención.

La invención se refiere además a un método para la
5 producción de un anticuerpo recombinante humano o humanizado según la invención, caracterizado porque se expresa un ácido nucleico según la invención en una célula hospedante procariota o eucariota y se recupera dicho anticuerpo de dicha célula o el líquido sobrenadante del cultivo celular. La
10 invención se refiere además al anticuerpo que puede obtenerse por dicho método recombinante.

Los anticuerpos según la invención son útiles en especial para la prevención de tumores secundarios/metástasis o para el tratamiento de enfermedades vasculares, por ejemplo
15 las retinopatías.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a la angiopoyetina-2 humana (ANG-2), caracterizado porque como región CDR3 de dominio variable de cadena
20 larga contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 49.

En una forma de ejecución de la invención, el anticuerpo se caracteriza porque

25 a) el dominio variable de cadena larga contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:

18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 42, o SEQ ID NO: 50, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43, o SEQ ID NO: 51 y

5 b) el dominio variable de cadena corta contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 44, o SEQ ID NO: 52, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 45, o SEQ ID NO: 10 53, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46, o SEQ ID NO: 54.

El anticuerpo se caracteriza con preferencia porque contiene

15 a) el dominio variable de cadena larga de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, o SEQ ID NO: 55; y

 b) el dominio variable de cadena corta de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 20 40, SEQ ID NO: 48, o SEQ ID NO: 56.

Otra forma de ejecución de la invención es un anticuerpo que se une específicamente a la ANG-2 humana, que se caracteriza porque el anticuerpo no se une específicamente a la angiopoyetina 1 humana (ANG-1). Los anticuerpos típicos, 25 que se unen específicamente a la ANG-2 humana, pero no a la ANG-1 humana, son p.ej. el Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06, Ang2i_LC07, o los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06,

Ang2i_LC07, Ang2i_LC10, con preferencia los que se unen al mismo epítotope que el Ang2i_LC06. Por tanto, en una forma de ejecución de la invención, el anticuerpo se une específicamente a la angiopoyetina-2 humana (ANG-2) pero no se une a la
5 ANG-1 humana por el mismo epítotope que el Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06, Ang2i_LC07, Ang2i_LC10, con preferencia por el mismo epítotope que el Ang2i_LC06. Tales anticuerpos que se unen específicamente a la ANG-2, pero no a la ANG-1 pueden tener propiedades mejoradas, por ejemplo eficacia,
10 menor toxicidad, propiedades farmacocinéticas, si se comparan con los anticuerpos específicos de la ANG-2 y de la ANG-1.

Por consiguiente, en una forma de ejecución de la invención, el anticuerpo, que se une específicamente a la angiopoyetina-2 humana (ANG-2) pero no a la ANG-1 humana, se
15 caracteriza porque:

a) el dominio variable de cadena larga contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, o SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, o SEQ ID
20 NO: 50, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, o SEQ ID NO: 51 y

b) el dominio variable de cadena corta contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, o SEQ ID NO: 52, una región CDR2 de la SEQ ID
25 NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, o SEQ ID NO: 53, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, o SEQ ID NO: 54.

Con preferencia, dicho anticuerpo que se une específicamente a la angiopoyetina-2 humana (ANG-2) pero no a la ANG-1 humana, se caracteriza por contener

a) el dominio variable de cadena larga de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, o SEQ ID NO: 55; y

b) el dominio variable de cadena corta de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, o SEQ ID NO: 56.

10 En una forma de ejecución, dicho anticuerpo según la invención se caracteriza porque

a) el dominio variable de cadena larga contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 9, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 10, y una región CDR1
15 de la SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 11 y

b) el dominio variable de cadena corta contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 12, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 13, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14.

20 En una forma de ejecución, dicho anticuerpo según la invención se caracteriza porque contiene:

a) el dominio variable de cadena larga de la SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 15; y

b) el dominio variable de cadena corta de la SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 16.
25

En una forma de ejecución, dicho anticuerpo según la invención se caracteriza porque

a) el dominio variable de cadena larga contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 1, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 2, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 3 y

b) el dominio variable de cadena corta contiene una
5 región CDR3 de la SEQ ID NO: 4, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 5, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 6.

En una forma de ejecución, dicho anticuerpo según la invención se caracteriza porque contiene:

a) el dominio variable de cadena larga de la SEQ ID NO:
10 7; y

b) el dominio variable de cadena corta de la SEQ ID NO:
8.

En una forma de ejecución, dicho anticuerpo según la invención se caracteriza porque

15 a) el dominio variable de cadena larga contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de la SEQ ID NO: 18, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 19 y

b) el dominio variable de cadena corta contiene una región CDR3 de la SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de la SEQ ID
20 NO: 21, y una región CDR1 de la SEQ ID NO: 22.

En una forma de ejecución, dicho anticuerpo según la invención se caracteriza porque contiene:

a) el dominio variable de cadena larga de la SEQ ID NO:
23; y

25 b) el dominio variable de cadena corta de la SEQ ID NO:
24.

El anticuerpo según la invención se caracteriza con preferencia porque dicho anticuerpo es del subgrupo IgG1 humano o es del subgrupo IgG4 humano.

El término "anticuerpo" abarca las diversas formas de estructuras de anticuerpo, incluidos, pero sin limitarse a ellos: los anticuerpos totales y los fragmentos de anticuerpo. El anticuerpo según la invención es con preferencia un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o incluso un anticuerpo de ingeniería genética, en el supuesto de que conserve las propiedades características según la invención.

Los "fragmentos de anticuerpo" contienen una porción de un anticuerpo de longitud completa, con preferencia el dominio variable del mismo, o por lo menos el sitio del mismo que se une al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen a los diacuerpos, las moléculas de anticuerpo de cadena simple (scFv o scFab) y los anticuerpos multiespecíficos (p.ej. biespecíficos) formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos scFv se han descrito, p.ej. en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203, 46-88, 1991). Además, los fragmentos de anticuerpo contienen polipéptidos de cadena simple que tienen las características del dominio V_H , a saber, que son capaces de combinarse con el dominio V_L , o las del dominio V_L que se une a la ANG-2, a saber, que son capaces de combinarse con el dominio V_H para formar un sitio de fijación funcional sobre el antígeno y, de este modo, aportar esta propiedad. Los scFv pueden estabilizarse p.ej. con a) un disulfuro (véase p.ej. en WO 94/029350, Rajagopal, V. y col., *Prot. Engin.* 10 (12), 1453-59, 1997; Kobayashi, H.

y col., Nuclear Medicine & Biology, vol. 25, 387-393, 1998; o Schmidt, M. y col., Oncogene 18, 1711-1721, 1999); o con b) estructuras estabilizadas (p.ej. con mutaciones específicas de estructuras estabilizadas específicas, véase p.ej. WO 5 2007/109254, p.ej. US7,258,985, Furrer, F., y col., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50 (2009), pp. 771-778 o Ottiger, M., y col., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50 (2009), pp. 779-786.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" se emplean aquí para indicar una 10 preparación de moléculas de anticuerpo de una composición simple de aminoácidos.

El término "anticuerpo quimérico" indica un anticuerpo que contiene una región variable, es decir, una región de fijación, de una fuente o especie y por lo menos una porción 15 de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, obtenido habitualmente por técnicas de DNA recombinante. Son preferidos los anticuerpos quiméricos que contienen una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de los "anticuerpos quiméri- 20 cos" contemplados en la presente invención son aquellas, en las que la región constante se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente en lo tocante a la fijación sobre Clq y/o la fijación sobre el receptor de Fc 25 (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos se denominan también "anticuerpos cambiados de grupo". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que contienen segmentos de DNA que codifican regiones variables

de inmunoglobulina y segmentos de DNA que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos incluyen las técnicas convencionales de DNA recombinante y de transfección genética, que los expertos
5 conocen bien, véase p.ej. Morrison, S.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855, 1984; US 5,202,238 y US 5,204,244.

El término "anticuerpo humanizado" indica anticuerpos en las que las regiones de estructura o "regiones determinan-
10 tes de complementariedad" (CDR) se han modificado para que contengan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente con respecto a la de la inmunoglobulina original. En una forma preferida de ejecución, se injerta una CDR murina en la región de estructura de un anticuerpo humano para
15 obtener el "anticuerpo humanizado", véase p.ej. Riechmann, L. y col., Nature 332, 323-327, 1988; y Neuberger, M.S. y col., Nature 314, 268-270, 1985. Las CDR especialmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen a los antígenos antes mencionados de los anticuerpos quiméri-
20 cos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" contemplados en la presente invención son aquellas, en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente con respecto al anticuerpo original para generar propiedades según la invención, en especial en lo que respecta a la unión
25 con el Clq y/o ala unión con el receptor de Fc (FcR).

El término "anticuerpo humano" se emplea aquí para indicar anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea

germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 368-374, 2001). Los anticuerpos humanos pueden obtenerse también en animales transgénico (p.ej., ratones) que, después de la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. La transferencia de la disposición genética de la inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal puede traducirse en la producción de anticuerpos humanos después del contacto con el antígeno (ver, p.ej., Jakobovits, A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-2555, 1993; Jakobovits, A. y col., Nature 362, 255-258, 1993; Bruggemann, M. y col., Year Immunol. 7, 33-40, 1993). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en bibliotecas de exposición de fagos (Hoogenboom, H.R. y Winter, G., J. Mol. Biol. 227, 381-388, 1992; Marks, J.D. y col., J. Mol. Biol. 222, 581-597, 1991). Se dispone también de las técnicas de Cole, S.P.C. y col. y de Boerner y col. para la obtención de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, S.P.C. y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.R., p. 77-96, 1985; y Boerner, P. y col., J. Immunol. 147, 86-95, 1991). Tal como se ha mencionado antes para los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, el término "anticuerpo humano" se emplea aquí para indicar los anticuerpos que se han modificado en la región constante para generar propiedades según la invención, en especial en lo que respecta a la unión al C1q y/o a la

unión al FcR, p.ej. por "cambio de grupo", es decir, cambio o mutación de partes del Fc (p.ej. de la IgG1 a la IgG4 y/o mutación IgG1/IgG4).

El término "anticuerpo humano recombinante" se emplea
5 aquí para indicar todos los anticuerpos humanos que se obtienen, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, como son los anticuerpos aislados de una célula hospedante por ejemplo una célula NS0 o CHO o de un animal (p.ej. un
10 ratón) que sea transgénico en cuanto a los genes de la inmunoglobulina humana o los anticuerpos expresados empleando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula hospedante. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en una forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes según la invención se han
15 sometido a una hipermutación somática "in vivo". Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL del anticuerpo recombinante son secuencias que, en cuanto derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de línea germinal humana, no pueden existir de modo natural en
20 del repertorio de líneas germinales de anticuerpos humanos "in vivo".

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena corta (V_L), región variable de una cadena larga (V_H) se emplea aquí para indicar cada uno de los pares de cadenas
25 cortas y largas que intervienen directamente en la fijación del anticuerpo sobre el antígeno. Los dominios de cadenas variables humanas, cortas y largas, tienen la misma estructura general y cada dominio contiene cuatro regiones de

estructura (FR), cuyas secuencias están muy conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de lámina β y las CDR
5 pueden formar bucles que conecten la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional gracias a las regiones de estructura y junto con las CDR de la otra cadena forman el sitio de fijación sobre el antígeno. Las regiones CDR3 de cadena larga y corta del
10 anticuerpo desempeñan un rol especialmente importante en la especificidad de unión/afinidad de los anticuerpos según la invención y por ello constituyen otro objeto de la invención.

El término "porción de un anticuerpo que se fija sobre el antígeno" se emplea aquí para indicar restos aminoácido de
15 un anticuerpo que son los que efectúan la unión al antígeno. La porción de un anticuerpo que se fija sobre el antígeno comprende los restos aminoácido de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones de "estructura" o regiones "FR" son aquellas regiones de dominio
20 variable distintas de los residuos de región hipervariable aquí definidos. Por tanto, los dominios variables de cadenas largas y cortas de un anticuerpo abarcan desde el extremo N al extremo C de los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. En especial, la CDR3 de cadena larga es la región, que
25 contribuye en mayor grado a la fijación sobre el antígeno y es la que define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan con arreglo a la definición estándar de Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological

Interest, 5^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable".

Los términos "ácido nucleico" o "molécula de ácido
5 nucleico", se emplean aquí para incluir las moléculas de DNA y las de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser de hebra simple o de hebra doble, pero es con preferencia un DNA de hebra doble.

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

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se
20 coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una pre-secuencia o líder secretorio está unido operativamente con un DNA de un polipéptido si se expresa como pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está
25 unido operativamente con una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de un ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificadora si está posicionado de tal manera que facilita

la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de DNA que se van a unir son contiguas, y, en el caso de un líder secretorio, son contiguas y están dentro del marco de lectura. Sin embargo, los intensificados
5 res no tienen que estar contiguos. La unión se realiza por ligación en sitios de restricción oportunos. Si no existen tales sitios, se emplearán adaptadores o engarces oligonucleótidos sintéticos con arreglo a la práctica convencional.

10 Tal como se emplean aquí, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se emplean indistintamente y todas las denominaciones incluyen la progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos
15 derivados de la misma con independencia del número de transferencias. Se da también por supuesto que toda la progenie puede que no sea exactamente idéntica en cuanto al contenido de DNA, debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o
20 actividad biológica que se ha explorado en la célula transformada original. Cuando existan distintas denominaciones, su significado resultará claro por el contexto.

Tal como se emplea aquí, el término "unión" o "fijación específica" indica la unión del anticuerpo a un epítipo del
25 antígeno (la ANG-2) en un ensayo "in vitro", con preferencia en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare Upsala, Suecia) (ejemplo 3) con el antígeno ANG-2 de tipo salvaje purificado. La afinidad de la unión se define en tér-

minos k_a (constante de velocidad de asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). La unión o fijación específica indica una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o menos, con
5 preferencia de 10^{-9} M a 10^{-13} moles/l.

La fijación del anticuerpo con el FcγRIII puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (GE-Healthcare, Upsala, Suecia). La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de velocidad de asociación del anti-
10 cuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a).

Tal como se emplea aquí, el término "que no se une a la ANG-1" o "que no se une específicamente a la ANG-1" indica que el anticuerpo tiene un valor EC50 superior a 8000 ng/ml
15 en un ensayo ELISA "in vitro" de fijación sobre la ANG-1 (según ejemplo 2).

El término "epítotope" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de la unión específica con un anticuerpo. En ciertas formas de ejecución, el determinante epítotope
20 incluye a grupos de moléculas de superficie químicamente activos, como son los aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas formas de ejecución, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características específicas de carga. Un
25 epítotope es una región de un antígeno que está unida a un anticuerpo.

La "parte Fc" de un anticuerpo no interviene directamente en la fijación de un anticuerpo sobre un antígeno, pero

presenta varias funciones efectoras. La "parte Fc de un anticuerpo" es un término que los expertos ya conocen y se define en base a la descomposición de anticuerpos con papaína. En función de la secuencia de aminoácidos de sus cadenas largas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en los siguientes grupos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de ellos pueden subdividirse a su vez en subgrupos (isotipos), p.ej. IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2. Según las regiones constantes de cadena larga, los diferentes grupos de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. La parte Fc de un anticuerpo interviene directamente en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) basada en la activación de complemento, la fijación a C1q y la fijación al receptor de Fc. La activación de complemento (CDC) se inicia con la fijación del factor de complemento de C1q sobre la parte Fc de la mayoría de los subgrupos de anticuerpos IgG. La influencia de un anticuerpo sobre el sistema de complemento depende de ciertas condiciones, mientras que la fijación sobre el C1q se debe a sitios de fijación definidos existentes en la parte Fc. Estos sitios de fijación ya son conocidos en el estado de la técnica y se han descrito p.ej. en Boakle, R.J. y col., Nature 282, 742-743, 1975; Lukas, T.J. y col., J. Immunol. 127, 2555-2560, 1981; Brunhouse, R. y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16, 907-917, 1979; Burton, D.R. y col., Nature 288, 338-344, 1980; Thommesen, J.E. y col., Mol. Immunol. 37, 995-1004, 2000; Idusogie, E.E. y col., J. Immunol. 164, 4178-4184, 2000; Hezareh, M. y col., J. Virology 75,

12161-12168, 2001; Morgan, A. y col., Immunology 86, 319-324, 1995; EP 0307434. Estos sitios de fijación son p.ej. el L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración con arreglo al índice EU de Kabat, ver más abajo). Los anti-
5 cuerpos del subgrupo IgG1, IgG2 e IgG3 presentan normalmente activación de complemento y fijación sobre C1q y C3, mientras que la IgG4 no activa el sistema de complemento y no se fija sobre el C1q ni el C3.

El anticuerpo según la invención comprende con prefe-
10 rencia una parte Fc de origen humano, que es una parte Fc de un anticuerpo humano del subgrupo IgG1.

El anticuerpo según la invención se caracteriza porque las cadenas constantes son de origen humano. Estas cadenas constantes son bien conocidas en el estado de la técnica y se
15 han descrito p.ej. en Kabat, E.A. (véase p.ej. Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28, 214-218, 2000). Por ejemplo, una región constante de cadena larga humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57 o de la SEQ ID NO: 58. Por ejemplo, una región constante de cadena corta
20 humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena corta kappa de la SEQ ID NO: 59, o de una región constante de cadena corta lambda de la SEQ ID NO: 60.

El término "región constante" se emplea en la presente
25 solicitud para indicar la suma de los dominios de un anticuerpo distintos a la región variable. La región constante no participa directamente en la fijación sobre un antígeno, pero posee varias funciones efectoras. En función de la secuencia

de aminoácidos de la región constante de sus cadenas largas, los anticuerpos se dividen en los subgrupos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de ellos pueden dividirse a su vez en subgrupos, por ejemplo el IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e
5 IgA2. Las regiones constantes de cadena larga que corresponden a los diferentes grupos de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de cadena corta, que pueden encontrarse en los cinco grupos de anticuerpo, se denominan κ (kappa) y λ (lambda).

10 El término "región constante derivada de origen humano" se emplea en la presente solicitud para indicar una región constante de cadena larga de un anticuerpo humano de los subgrupos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región constante de cadena corta kappa o lambda. Dichas regiones constantes son
15 bien conocidas en el estado de la técnica y se han descrito por Kabat, E.A., (véase p.ej. Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28, 214-218, 2000; Kabat, E.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2785-2788, 1975).

Los anticuerpos del subgrupo IgG4 presentan una menor
20 fijación sobre el receptor de Fc (Fc γ RIIIa), mientras que los anticuerpos de otros subgrupos IgG presentan una unión fuerte. Sin embargo, el Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida del hidrato de carbono de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lis288, Thr307, Gln311,
25 Asn434 y His435 son restos que, si se alteran, proporcionan también una fijación reducida sobre el receptor del Fc (Shields, R.L. y col., J. Biol. Chem. 276, 6591-6604, 2001;

Lund, J. y col., FASEB J. 9, 115-119, 1995; Morgan, A. y col., Immunology 86, 319-324, 1995; EP 0 307 434).

En una forma de ejecución, un anticuerpo según la invención tiene una fijación reducida sobre el FcR si se
5 compara con un anticuerpo IgG1 y el anticuerpo original mono-específico bivalente en lo que respecta a la fijación sobre el FcR es del subgrupo IgG4 o del subgrupo IgG1 o IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una forma de ejecución, las mutaciones en
10 el anticuerpo original monoespecífico bivalente son la S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236. En otra forma de ejecución, las mutaciones en el anticuerpo original monoespecífico bivalente son la S228P en la IgG4 y las L234A y L235A en la IgG1. Las regiones constantes de cadena larga se representan
15 en las SEQ ID NO: 57 y 58. En una forma de ejecución, la región constante de cadena larga del anticuerpo original monoespecífico bivalente es de la SEQ ID NO: 57 con las mutaciones L234A y L235A. En otra forma de ejecución, la región constante de cadena larga del anticuerpo original monoespe-
20 cífico bivalente es de la SEQ ID NO: 58 con la mutación S228P. En otra forma de ejecución, la región constante de cadena corta del anticuerpo original monoespecífico bivalente es la región de cadena corta kappa de la SEQ ID NO: 59 o la región de cadena corta lambda de la SEQ ID NO: 60. Con pre-
25 ferencia, la región constante de cadena larga del anticuerpo original monoespecífico bivalente es de la SEQ ID NO: 57 o de la SEQ ID NO: 58 con la mutación S228P.

La región constante de un anticuerpo participa directamente en la ADCC (citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo) y en la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). La activación del complemento (CDC) se inicia con la fijación del factor de complemento Clq sobre la región constante de la mayor parte de los subgrupos de anticuerpos IgG. La fijación del Clq sobre un anticuerpo viene provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el sitio llamada de fijación. Dichos sitios de fijación de región constante se conocen en el estado de la técnica y se han descrito p.ej. en Lukas, T.J. y col., J. Immunol. 127, 2555-2560, 1981; Brunhouse, R. y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16, 907-917, 1979; Burton, D.R. y col., Nature 288, 338-344, 1980; Thommesen, J.E. y col., Mol. Immunol. 37, 995-1004, 2000; Idusogie, E.E. y col., J. Immunol. 164, 4178-4184, 2000; Hezareh, M. y col., J. Virol. 75, 12161-12168, 2001; Morgan, A. y col., Immunology 86, 319-324, 1995; y EP 0 307 434. Dichos sitios de fijación de región constante se caracterizan p.ej. por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat).

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)" indica la lisis de células diana humanas por acción de un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide con preferencia mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan al CCR5 con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, por ejemplo las PBMC recién aisladas o las

células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias (buffy coats), como son los monocitos o las células asesinas naturales (NK) o una línea celular de NK de crecimiento permanente.

5 El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" indica un proceso iniciado con la fijación del factor de complemento C1q sobre la parte Fc de la mayoría de subgrupos de anticuerpos IgG. La unión del C1q a un anticuerpo es causada por interacciones proteína-proteína definidas en
10 el sitio llamado de fijación. Dichos sitios de fijación de la parte Fc son conocidos en el estado de la técnica (ver más arriba). Dichos sitios de fijación de la parte Fc se caracterizan p.ej. por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU
15 de Kabat). Los anticuerpos de los subgrupos IgG1, IgG2 e IgG3 presentan normalmente activación del complemento incluida la fijación sobre el C1q y C3, mientras que el IgG4 no activa el sistema de complemento y no se fija sobre el C1q y/o el C3.

El anticuerpo según la invención se produce por métodos
20 recombinantes. Por tanto, un aspecto de la presente invención es un ácido nucleico que codifica al anticuerpo según la invención y otro aspecto es una célula que contiene dicho ácido nucleico que codifica a un anticuerpo según la invención. Los métodos de producción recombinante son muy conocidos en el
25 estado de la técnica y consisten en la expresión de la proteína en células procariotas y eucariotas y el posterior aislamiento del anticuerpo y normalmente la purificación del mismo hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la

expresión de los anticuerpos del modo antes mencionado en una célula hospedante, se insertan los ácidos nucleicos que codifican a las correspondientes cadenas cortas y largas modificadas en vectores de expresión por métodos estándar. La
5 expresión se realiza en células hospedantes eucariotas o procariotas apropiadas, por ejemplo células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células de *E. coli* y se recupera el anticuerpo de las células (del líquido sobrenadante o de las células des-
10 pués de la lisis). Los métodos generales de producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos en el estado de la técnica y se han descrito por ejemplo en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17, 183-202, 1999; Geisse, S. y col., *Protein Expr. Purif.* 8, 271-282,
15 1996; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16, 151-161, 2000; Werner, R.G., *Drug Res.* 48, 870-880, 1998.

Los anticuerpos según la invención se separan del medio de cultivo de modo conveniente por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina, por ejemplo, pro-
20 teína A-sefarosa, cromatografía a través de hidroxilapatita, electroforesis a través de gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El DNA y el RNA que codifican a los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia aplicando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pue-
25 den servir como fuentes de dichos DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA puede insertarse en vectores de expresión, que se transfectan a células hospedantes del tipo células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otro modo no produ-

cirían proteína de inmunoglobulina para realizar la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en células hospedantes.

Las variantes de secuencias de aminoácidos (o mutantes) del anticuerpo según la invención se obtienen introduciendo los cambios apropiados de nucleótidos en el DNA del anticuerpo o por síntesis de nucleótidos. Sin embargo, estas modificaciones pueden realizarse solamente en un intervalo muy limitado, p.ej. del modo antes descrito. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características del anticuerpo antes mencionadas, por ejemplo el isotipo de IgG y la fijación sobre el antígeno, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

El término "célula hospedante" se emplea en la presente solicitud para indicar cualquier tipo de sistema celular que puede diseñarse para generar los anticuerpos según la presente invención. En una forma de ejecución, las células HEK293 y las células CHO se emplean como células hospedantes. Tal como se emplea aquí, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se emplean indistintamente y todas las denominaciones incluyen a la progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. Se da también por supuesto que toda la progenie puede que no sea exactamente idéntica en cuanto al contenido de DNA, debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la

progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que se ha explorado en la célula transformada original.

La expresión en células NS0 se ha descrito p.ej. en
5 Barnes, L.M. y col., Cytotechnology 32, 109-123, 2000;
Barnes, L.M. y col., Biotech. Bioeng. 73, 261-270, 2001. La
expresión transitoria se ha descrito p.ej en Durocher, Y. y
col., Nucl. Acids. Res. 30, E9, 2002. La clonación de los
dominios variables se ha descrito en Orlandi, R. y col.,
10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833-3837, 1989; Carter, P. y
col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289, 1992; y
Norderhaug, L. y col., J. Immunol. Methods 204, 77-87, 1997.
Un sistema de expresión transitoria preferido (HEK 293) se ha
descrito en Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., en Cytotech-
15 nology 30, 71-83, 1999 y en Schlaeger, E.-J., en J. Immunol.
Methods 194, 191-199, 1996.

Las secuencias de control idóneas para procariotas, por
ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de
operador y un sitio de unión a un ribosoma. Se sabe que las
20 células eucariotas utilizan promotores, intensificadores y
señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se
coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido
nucleico. Por ejemplo, el DNA de una pre-secuencia o líder
25 secretorio está unido operativamente con un DNA de un poli-
péptido si se expresa como pre-proteína que participa en la
secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está
unido operativamente con una secuencia codificadora si afecta

la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de un ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificadora si está posicionado de tal manera que facilita la traducción. En general, "unido operativamente" significa que
5 las secuencias de DNA que se van a unir son contiguas, y, en el caso de un líder secretorio, son contiguas y están dentro del marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza por ligación en sitios de restricción oportunos. Si no existen tales
10 sitios, se emplearán adaptadores o engarces oligonucleótidos sintéticos con arreglo a la práctica convencional.

La purificación de anticuerpos se realiza con el fin de eliminar componentes celulares u otros contaminantes, p.ej. otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas
15 estándar, incluido el tratamiento alcalino/SDS, el contraste (banding) con CsCl, la cromatografía de columna, la electroforesis a través de gel de agarosa y otros métodos bien conocidos de la técnica, véase Ausubel, F. y col., coord., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y
20 Wiley Interscience, Nueva York (1987). Los diferentes métodos se han consolidado y se emplean con frecuencia para la purificación de proteínas, por ejemplo la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (p.ej. cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de
25 intercambio iónico (p.ej. intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) y de intercambio mixto), la adsorción tiófila (p.ej. con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), la interacción

hidrófoba o la cromatografía de adsorción aromática (p.ej. con fenil-sefarosa, resinas aza-arenófilas o con ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad con quelatos metálicos (p.ej. con material de afinidad Ni(II) y Cu(II)),
5 la cromatografía de exclusión de tamaños y los métodos electroforéticos (por ejemplo la electroforesis a través de gel, la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75, 93-102, 1998).

La invención se refiere a un método para el tratamiento
10 de un paciente que necesite la terapia, caracterizado por administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención.

La invención se refiere al uso de un anticuerpo según la invención para la terapia.

15 La invención se refiere al uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado a la prevención de las metástasis.

La invención se refiere al uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado
20 al tratamiento del cáncer.

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención. Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de una composición farmacéutica.
25 céutica. Otro aspecto de la invención es un método para la fabricación de una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, p.ej. una composición

farmacéutica, que contiene un anticuerpo según la presente invención, formulado junto con un vehículo farmacéutico.

Una forma de ejecución de la invención es dicha composición farmacéutica para la prevención de las metástasis.

5 Una forma de ejecución de la invención es un anticuerpo según la invención para la prevención de las metástasis.

Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado a la prevención de las metástasis.

10 Otro aspecto de la invención es método de prevención de metástasis de un paciente que sufre un cáncer primario, que consiste en administrar un anticuerpo según la invención a un paciente que necesite dicho tratamiento preventivo.

Hemos podido demostrar la prevención altamente eficaz
15 de las metástasis espontáneas/tumores secundarios "in vivo" en un modelo de cáncer ortotópico y otro subcutáneo (véase el ejemplo 9) (a diferencia del modelo experimental, en el que las células tumorales se inyectan por vía i.v.). Esto es similar a la situación clínica, en la que las células se dise-
20 minan a partir de un tumor primario y efectúan la metástasis hacia órganos secundarios, por ejemplo el pulmón o el hígado (donde se desarrollan los tumores secundarios).

El término "metástasis" según la invención se emplea para indicar la transmisión de células cancerosas del tumor
25 primario hacia uno o más sitios diferentes de un paciente, en los que se desarrollan los tumores secundarios. Los medios para determinar si un cáncer ha efectuado metástasis ya con conocidos en la técnica e incluyen el escaneo de los huesos,

los rayos X del tórax, el escaneo CAT, el escaneo MRI y los ensayos con marcadores tumorales.

Los términos "prevención de metástasis" y "prevención de tumores secundarios" se emplean aquí con el mismo significado para indicar un agente profiláctico contra las metástasis en un paciente que sufra un cáncer reincidente positivo de HER2, que de este modo inhibe o reduce la transmisión ulterior de las células cancerosas del tumor primario hacia uno o más sitios situados en otras zonas del paciente. Esto significa que se previene, retrasa o reduce la metástasis del tumor primario o del cáncer y, de este modo, se previene, se retrasa o se reduce el desarrollo de tumores secundarios. Se previenen o se reducen con preferencia las metástasis, es decir, los tumores secundarios de pulmón, lo cual significa que se previene o se reduce la transmisión metastásica de células cancerosas del tumor primario hacia el pulmón.

Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo según la invención para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es método de tratamiento de un paciente que sufre un cáncer, que consiste en la administración de un anticuerpo según la invención a un paciente que necesite dicho tratamiento.

Tal como se emplea aquí, "vehículo farmacéutico" incluye a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción y similares que
5 sean fisiológicamente compatibles. Con preferencia, el vehículo es idóneo para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p.ej. por inyección o infusión).

Una composición de la presente invención puede administrarse por una gran variedad de métodos ya conocidos de la
10 técnica. Los expertos sabrán apreciar que la vía y/o el modo de administración pueden variar en función de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención por ciertas vías de administración, puede ser necesario revestir
15 el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen la solución salina y
20 las soluciones acuosas tamponadas. Los vehículos farmacéuticos incluyen las soluciones o dispersiones acuosas estériles y los polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente
25 activas ya es conocido en la técnica.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" se emplea aquí para indicar los modos de administración diferentes de la administración enteral y

tópica, normalmente por inyección e incluyen, sin limitación, la inyección intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradermal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal y la infusión.

El término "cáncer" se emplea aquí para indicar enfermedades proliferativas, por ejemplo linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no de células pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquiol-alveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula paratiroides, cáncer de cápsula suprarrenales, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñones o de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamo-

sas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewing, incluidas las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres recién mencionados o las combinaciones de uno o más de los cánceres anteriores.

5 Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica como agente anti-angiogénico. Tal agente anti-angiogénico puede utilizarse para el tratamiento del cáncer, en especial tumores sólidos y otras enfermedades vasculares.

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

 Una forma de ejecución de la invención es el anticuerpo según la invención para el tratamiento de enfermedades vasculares.

15 Una forma de ejecución de la invención es el anticuerpo según la invención para el tratamiento de la retinopatía.

 Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la retinopatía.

20 Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de un paciente que sufra enfermedades vasculares, que consiste en la administración un anticuerpo según la invención a un paciente que necesite dicho tratamiento.

25 El término "enfermedades vasculares" incluye el cáncer, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis, isquemia, trauma, sepsis, COPD, asma, diabetes, AMD, retinopatía, apoplejía, adiposidad, lesión pulmonar aguda, hemorragias, derrame vascular, p.ej. inducido por citoquinas, alergia, enfermedad de

Graves, tiroiditis autoinmune de Hashimoto, púrpura trombo-
citopénica idiopática, arteritis de células gigantes, artritis
reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis
por lupus, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, colitis
5 ulcerante, en especial los tumores sólidos, síndromes neovas-
culares intraoculares, por ejemplo retinopatías proliferati-
vas o la degeneración macular debida a la edad (AMD), artritis
reumatoide y psoriasis (Folkman, J. y col., J. Biol.
Chem. 267, 10931-10934, 1992; Klagsbrun, M. y col., Annu.
10 Rev. Physiol. 53, 217-239, 1991; y Garner, A., Vascular
diseases, en: Pathobiology of ocular disease, A dynamic
approach, Garner, A. y Klintworth, G.K., (coord.), 2ª
edición, Marcel Dekker, Nueva York, 1994, pp. 1625-1710).

Estas composiciones pueden contener también adyuvantes
15 como son los conservantes, agentes humectantes, agentes emul-
sionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presen-
cia de microorganismos puede asegurarse tanto con procedi-
mientos de esterilización, ver más arriba, como por la
inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos,
20 por ejemplo, parabén, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y
similares. Puede ser también deseable la inclusión de agentes
isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro sódico y similares
a las composiciones. Además, la absorción prolongada de la
forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la
25 inclusión de agentes que retarden la absorción, como son el
monoesterato de aluminio y la gelatina.

Con independencia de la vía de administración elegida,
los compuestos de la presente invención, que pueden utili-

zarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales, que los expertos ya conocen.

5 Los niveles actuales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse con el fin de obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada en un paciente, una composición y un modo
10 de administración concretos, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación elegido dependerá de un gran número de factores farmacocinéticos, incluida la actividad de las composiciones concretas de la presente invención que se empleen, la vía de administración, el tiempo de administración,
15 ción, la velocidad de excreción del compuesto concreto que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales que se utilicen en combinación con las composiciones concretas empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado patológico, el estado general de salud y el
20 historial médico previo del paciente a tratar así como los factores bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición tiene que ser estéril y líquida en un grado tal que la composición pueda administrarse con una jeringuilla. Además del agua, el vehículo es con preferencia
25 una solución salina tamponada isotónica.

La fluidez correcta puede mantenerse, por ejemplo, con el uso de recubrimiento, tal como la lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y con

el uso de tensioactivos. En muchos casos es preferible incorporar a la composición agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como la manita o la sorbita y cloruro sódico.

5 Las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se emplean aquí indistintamente y todas las denominaciones incluyen la progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma con
10 independencia del número de transferencias. Se da también por supuesto que toda la progenie puede que no sea exactamente idéntica en cuanto al contenido de DNA, debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que
15 se ha explorado en la célula transformada original. Cuando existan distintas denominaciones, su significado resultará claro por el contexto.

El término "transformación" se emplea aquí para indicar un proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico a una
20 célula hospedante. Si se emplean como células hospedantes células sin barrera de pared celular formidable, la transfección se puede llevar a cabo p.ej. por el método de precipitación con fosfato cálcico descrito por Graham, F.L., van der Eb, Virology 52, 456-467, 1973. Sin embargo pueden em-
25 plearse también otros métodos de introducción del DNA en las células, como son la inyección nuclear o la fusión de protoplastos. Si se emplean células procariotas o células que contienen construcciones sustanciales de pared celular, p.ej. un

método de transfección el tratamiento con calcio empleando el cloruro cálcico, descrito por Cohen, F.N. y col., PNAS 69, 7110 y sig., 1972.

Tal como se emplea aquí, "expresión" indica el proceso por el que un ácido nucleico se transcribe al mRNA y/o el proceso por el que el mRNA transcrito (también llamado transcrito) se traduce seguidamente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente productos genéticos. Si el polinucleótido deriva del DNA genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir el empalme del mRNA.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular una molécula autorreplicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada a y/o entre células hospedantes. El término incluye a los vectores que funcionan primariamente para la inserción de DNA o RNA en una célula (p.ej., integración cromosómica), la replicación de vectores que funcionan primariamente para la replicación de DNA o RNA y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del DNA o RNA. Se incluyen también los vectores que proporcionan más de una de las funciones descritas.

Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula hospedante apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un "sistema de expresión" se emplea normalmente para indicar una célula hospedante apropiada que consta de un vector de expresión que puede funcionar para generar un producto de expresión deseado.

Los ejemplos, listado de secuencia y figuras siguientes se facilitan para ayudar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se define en las reivindicaciones anexas. Se da por supuesto que se pueden introducir modificaciones en los procedimientos presentados sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de las secuencias de aminoácidos

SEQ ID NO: 1 CDR3 de cadena larga, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 2 CDR2 de cadena larga, <ANG-2> Ang2i_LC06
10 SEQ ID NO: 3 CDR1 de cadena larga, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 4 CDR3 de cadena corta, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 5 CDR2 de cadena corta, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 6 CDR1 de cadena corta, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 7 dominio variable de cadena larga, <ANG-
15 2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 8 dominio variable de cadena corta, <ANG-
2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 9 CDR3 de cadena larga, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 10 CDR2 de cadena larga, <ANG-2>Ang2i_LC07
20 SEQ ID NO: 11 CDR1 de cadena larga, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 12 CDR3 de cadena corta, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 13 CDR2 de cadena corta, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 14 CDR1 de cadena corta, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 15 dominio variable de cadena larga, <ANG-
25 2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 16 dominio variable de cadena corta, <ANG-
2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 17 CDR3 de cadena larga, <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 18 CDR2 de cadena larga, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 19 CDR1 de cadena larga, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 20 CDR3 de cadena corta, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 21 CDR2 de cadena corta, <ANG-2> Ang2k_LC08
5 SEQ ID NO: 22 CDR1 de cadena corta, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 23 dominio variable de cadena larga, <ANG-2>
Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 24 dominio variable de cadena corta, <ANG-2>
Ang2k_LC08
10 SEQ ID NO: 25 CDR3 de cadena larga, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 26 CDR2 de cadena larga, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 27 CDR1 de cadena larga, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 28 CDR3 de cadena corta, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 29 CDR2 de cadena corta, <ANG-2> Ang2s_LC09
15 SEQ ID NO: 30 CDR1 de cadena corta, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 31 dominio variable de cadena larga, <ANG-2>
Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 32 dominio variable de cadena corta, <ANG-2>
Ang2s_LC09
20 SEQ ID NO: 33 CDR3 de cadena larga, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 34 CDR2 de cadena larga, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 35 CDR1 de cadena larga, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 36 CDR3 de cadena corta, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 37 CDR2 de cadena corta, <ANG-2> Ang2i_LC10
25 SEQ ID NO: 38 CDR1 de cadena corta, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 39 dominio variable de cadena larga, <ANG-2>
Ang2i_LC10

SEQ ID NO: 40 dominio variable de cadena corta, <ANG-2>
Ang2i_LC10

SEQ ID NO: 41 CDR3 de cadena larga, <ANG-2> Ang2k_LC11

SEQ ID NO: 42 CDR2 de cadena larga, <ANG-2> Ang2k_LC11

5 SEQ ID NO: 43 CDR1 de cadena larga, <ANG-2> Ang2k_LC11

SEQ ID NO: 44 CDR3 de cadena corta, <ANG-2> Ang2k_LC11

SEQ ID NO: 45 CDR2 de cadena corta, <ANG-2> Ang2k_LC11

SEQ ID NO: 46 CDR1 de cadena corta, <ANG-2> Ang2k_LC11

SEQ ID NO: 47 dominio variable de cadena larga, <ANG-2>
10 Ang2k_LC11

SEQ ID NO: 48 dominio variable de cadena corta, <ANG-2>
Ang2k_LC11

SEQ ID NO: 49 CDR3 de cadena larga, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

SEQ ID NO: 50 CDR2 de cadena larga, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

15 SEQ ID NO: 51 CDR1 de cadena larga, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

SEQ ID NO: 52 CDR3 de cadena corta, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

SEQ ID NO: 53 CDR2 de cadena corta, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

SEQ ID NO: 54 CDR1 de cadena corta, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

SEQ ID NO: 55 dominio variable de cadena larga, <ANG-2>
20 Ang2s_R3_LC03

SEQ ID NO: 56 dominio variable de cadena corta, <ANG-2>
Ang2s_R3_LC03

SEQ ID NO: 57 región constante de cadena larga humana
derivada de la IgG1

25 SEQ ID NO: 58 región constante de cadena larga humana
derivada de la IgG4

SEQ ID NO: 59 región constante de cadena corta kappa

SEQ ID NO: 60 región constante de cadena corta lambda

SEQ ID NO: 61 receptor de Tie-2 humano

SEQ ID NO: 62 angiopoyetina-2 humana (ANG-2) con líder y His-tag

SEQ ID NO: 63 angiopoyetina-1 humana (ANG-1) con líder y His-tag

Descripción de las figuras

Figura 1: clonación de las IgG para A): la expresión transitoria en vectores de expresión Ang2i-LC06 (figura 1A) y para B): la expresión en vectores Ang2i-LC06 (figura 1B)

10 Figura 2: gel SDS-PAGE de anticuerpos anti-ANG-2 purificados Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 y Ang2k-LC08

Figura 3: interacción angiopoyetina-Tie2 según ELISA

Figura 4: inhibición de la fijación de ANG-2 sobre el Tie2 causada por el Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08

15 Figura 5: inhibición de la fijación de ANG-1 sobre el Tie2 causada por el Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08

Figura 6: modelo de injerto ajeno (xenograft) Colo205 para demostrar la eficacia "in vivo" de los anticuerpos anti-ANG-2

20 Figura 7: modelo de injerto ajeno de KPL-4 para demostrar la eficacia "in vivo" de los anticuerpos anti-ANG-2

Figura 8: fijación sobre la ANG-1 mediante un sensograma Biacore

Figura 9: prevención de la metástasis/tumores secundarios pulmonares mediante anticuerpos según la invención en el
25 injerto ajeno de tumor de colon primario (9A) y en el injerto ajeno de tumor de mama primario (9B)

Figura 10: inhibición de la retinopatía mediante anticuerpos según la invención

Procedimiento experimental 1

Materiales y métodos generales

La información general respecto a las secuencias de nucleótido de las cadenas cortas y largas de inmunoglobulinas humanas se encontrará en: Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpo se numeran y nombran según la numeración EU (Edelman, G.M. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 78-85, 1969; Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Técnicas de DNA recombinante

Para manipular el DNA se aplican los métodos estándar descritos en Sambrook, J. y col., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos de biología molecular se emplean con arreglo a las instrucciones del fabricante.

Síntesis genética

Los segmentos deseados de los genes se obtienen a partir de los oligonucleótidos formados por síntesis química. Los segmentos de los genes, flanqueados por sitios de rotura de endonucleasa de restricción concreta, se ensamblan por fusión y ligación de los oligonucleótidos, incluyendo la amplificación PCR y posteriormente se clonan mediante los sitios de restricción indicados, p.ej. KpnI/SacI o AscI/PacI

en un vector de clonación pGA4 basado en el pPCRScripT (Stratagene). Las secuencias de DNA de los fragmentos de genes subclonados se confirman por secuenciación del DNA. Los fragmentos de la síntesis genética se ordenan con arreglo a las especificaciones indicadas por Geneart (Regensburg, Alemania).

Determinación de la secuencia de DNA

Se determinan las secuencias de DNA por secuenciación de doble hebra realizada en MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o en Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemania).

Análisis de las secuencias de DNA y proteína y gestión de los datos de secuencia

Se emplea el paquete informático de GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) versión 10.2 y la suite Vector NT1 Advance de Infomax, versión 8.0, para la creación, mapeo, análisis, anotación e ilustración de las secuencias.

Vectores de expresión

Para la expresión de anticuerpos descritos se aplican variantes de plásmidos de expresión para células de expresión transitoria (p.ej. en células HEK293 EBNA o HEK293-F) o de expresión estable (p.ej. en células CHO) basada en una organización de cDNA con un promotor de CMV-intrón A o en una organización genómica con un promotor CMV (p.ej. figura 1).

Además del cassette de expresión del anticuerpo, los vectores contienen:

- un origen de replicación que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y

- un gen de β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción del gen del anticuerpo se compone de los elementos siguientes:

- 5 - sitio o sitios de restricción únicos en el extremo 5'
- el intensificador inmediatamente anterior y el promotor del citomegalovirus humano,
- seguido por la secuencia del intrón A en el caso de la organización de cDNA,
- 10 - una región 5' sin traducir de un gen de anticuerpo humano,
- una secuencia de señal de cadena larga de inmunoglobulina,
- la cadena de anticuerpo humano (cadena larga, cadena larga modificada o cadena corta) ya sea como organización de cDNA, ya sea como organización genómica con una organización exón-intrón de inmunoglobulina
- 15 - una región 3' sin traducir con una secuencia de señal de poliadenilación y
- un sitio o sitios de restricción únicos en el extremo 3'.

Los genes de fusión que contienen las secuencias de
20 cadena larga del anticuerpo seleccionado descritas a continuación se generan por PCR y/o síntesis genética y se ensamblan por métodos y técnicas recombinantes conocidos mediante conexión de los correspondientes segmentos de ácido nucleico, p.ej. empleando sitios NsiI y EcoRI únicos en los
25 vectores genómicos de cadena larga. Las secuencias ácido nucleico subclonado se verifican por secuenciación del DNA. Para las transfecciones transitorias y estables se preparan cantidades considerables de plásmidos mediante producción de

plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Técnicas de cultivo celular

Se aplican las técnicas estándar de cultivo celular
5 descritas en Current Protocols in Cell Biology 2000, Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. e Yamada, K.M. (coord.), John Wiley & Sons, Inc.

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

Se generan los anticuerpos por transfección transitoria
10 de los dos plásmidos que codifican a la cadena larga y a la cadena larga modificada, respectivamente y a la cadena corta correspondiente, empleando el sistema HEK293-F (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumiendo, se transfectan las células HEK293-F (Invitrogen) cultivadas en
15 suspensión, ya sea en frasco de agitación o en un fermentado agitado en medio de expresión FreeStyle 293 exento de suero (Invitrogen) con una mezcla de los dos plásmidos de expresión respectivos y 293fectina o fectina (Invitrogen). Por ejemplo, para un frasco agitador de 2 l (Corning) se siembran las
20 células HEK293-F con una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/ml en 600 ml y se incuban a 120 rpm, con un 8% de CO₂. Al día siguiente se transfectan las células en una densidad de aprox. $1,5 \times 10^6$ células/ml con aprox. 42 ml de una mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 µg de DNA plásmido
25 total (1 µg/ml) que codifica a la cadena larga o la cadena larga modificada, respectivamente y la correspondiente cadena corta en una proporción equimolar y B) 20 ml de Opti-MEM + 1,2 ml de 293-fectina o fectina (2 µl/ml). A medida que se

consume la glucosa se añade solución de glucosa solución durante el curso de la fermentación. Después de 5-10 días se recolecta el líquido sobrenadante que contiene el anticuerpo secretado y se purifican los anticuerpos directamente del
5 líquido sobrenadante o bien se congela el líquido sobrenadante y se almacena.

Determinación de las proteínas

Se determina la concentración de proteína de los anticuerpos purificados y de los derivados hallando la densidad óptica (OD) a 280 nm, empleando un coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos según Pace, C.N. y col., Protein Science 4, 1411-1423, 1995.
10

Determinación de la concentración de anticuerpos en líquidos sobrenadantes

15 La concentración de anticuerpos y derivados en el líquido sobrenadante de los cultivos celulares se estimula por inmunoprecipitación con esferillas de proteína A-agarosa (Roche). Se lavan tres veces 60 µl de esferillas de proteína A-agarosa con TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1%
20 Nonidet-P40). A continuación se aplican 1-15 ml de líquido sobrenadante del cultivo celular sobre las esferillas de proteína A-agarosa pre-equilibradas con TBS-NP40. Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente se lavan las esferillas en una columna filtro Ultrafree-MC (Amicon) una vez
25 con 0,5 ml de TBS-NP40, dos veces con 0,5 ml 2x de solución salina tamponada con fosfato (2xPBS, Roche) y brevemente cuatro veces con 0,5 ml de 100 mM Na-citrato de pH 5,0. Se eluye el anticuerpo fijado por adición de 35 µl de tampón de

muestras NuPAGE[®] LDS (Invitrogen). Se reúne la mitad de la muestra con agente reductor de muestra NuPAGE[®] o se deja sin reducir, respectivamente y se calienta a 70°C durante 10 min. A continuación se aplican 20 µl a un NuPAGE[®] Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) del 4-12% (con tampón MOPS para el SDS-PAGE sin reducir y tampón MES con aditivo tampón de trabajo antioxidante NuPAGE[®] (Invitrogen) para el SDS-PAGE reducido) y se tiñen con azul Coomassie.

Se mide la concentración de anticuerpos y derivados en el líquido sobrenadante de los cultivos celulares por cromatografía HPLC en proteína A. Resumiendo, se aplican el líquido sobrenadante de los cultivos celulares que contiene anticuerpos y derivados a fijar sobre la proteína A en la parte superior de una columna HiTrap de proteína A (GE Healthcare) en 50 mM K₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 7,3 y se eluye de la matriz con 550 mM ácido acético, de pH 2,5 en un sistema HPLC Dionex. Se cuantifica la proteína eluida por absorbancia UV e integración de las áreas de los picos. Se emplea como patrón un anticuerpo IgG1 patrón purificado.

Como alternativa, se mide la concentración de anticuerpos y derivados en el líquido sobrenadante de los cultivos celulares en un ensayo sandwich-IgG-ELISA. Resumiendo, se recubren placas de microvaloración StreptaWell High Bind estreptavidina A de 96 hoyos (Roche) con 100 µl/hoyo de la molécula de captura IgG anti-humana biotinilada F(ab')₂<h-Fcγ> BI (Dianova) a razón de 0,1 µg/ml a temperatura ambiente durante 1 h o como alternativa a 4°C durante una noche y después se lava tres veces con 200 µl/hoyo de PBS, 0,05%

Tween (PBST, Sigma). Se añaden a los hoyos 100 µl/hoyo de una serie de diluciones en PBS (Sigma) del anticuerpo correspondiente que contienen el líquido sobrenadante de los cultivos celulares y se incuban durante 1-2 h en un agitador de placas de microvaloración a temperatura ambiente. Se lavan los hoyos tres veces con 200 µl/hoyo de PBST y se detecta el anticuerpo fijado con 100 µl de F(ab')₂-hFcγ₁POD (Dianova) a 0,1 µg/ml como anticuerpo de detección en un agitador de placas de microvaloración a temperatura ambiente durante 1-2 h. Se elimina por lavado el anticuerpo de detección no fijado tres veces con 200 µl/hoyo de PBST y se detecta el anticuerpo de detección fijado por adición de 100 µl de ABTS/hoyo. La determinación de la absorbancia se realiza en un espectrómetro del tipo Tecan Fluor en una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia: 492 nm).

Purificación de las proteínas

Se purifican las proteínas del líquido sobrenadante filtrado de los cultivos celulares con arreglo a métodos estándar. Resumiendo, se aplican los anticuerpos a una columna de proteína A-sefarosa (GE Healthcare) y se lavan con PBS. Se efectúa la elución de los anticuerpos a pH ácido e inmediatamente después se neutraliza la muestra. Se separa la proteína agregada de los anticuerpos monoméricos por cromatografía de exclusión de tamaños (Superdex 200, GE Healthcare) en 20 mM histidina, 140 mM NaCl de pH 6,0. Se reúnen las fracciones de anticuerpo monomérico, se concentran, si fuera necesario empleando p.ej. un concentrador centrifugador

MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), y se almacenan a -80°C . Una parte de las muestras se emplea para el siguiente análisis de la proteína y para la caracterización analítica, p.ej. por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión de tamaños, espectrometría de masas y determinación de endotoxinas (ver figura 2).

SDS-PAGE

Se emplea el sistema de gel NuPAGE[®] Pre-Cast (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En concreto se emplean los geles 4-20 % NuPAGE[®] Novex[®] TRIS-glicina Pre-Cast y un tampón de trabajo Novex[®] TRIS-glicina SDS (ver p.ej. figura 1). Se efectúa la reducción de las muestras por adición del agente reductor de muestras NuPAGE[®] antes de cromatografía a través del gel.

Cromatografía analítica de exclusión de tamaños

La cromatografía de exclusión de tamaños para la determinación de la agregación y el estado oligomérico de los anticuerpos se realiza por cromatografía HPLC. Resumiendo, los anticuerpos purificados con proteína A se aplican a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ de pH 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100 o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un sistema HPLC Dionex. Se cuantifica la proteína eluida por absorbancia UV e integración de las áreas de los picos. Como patrón se emplea el BioRad Gel Filtration Standard 151-1901.

Espectrometría de masas

Se determina la masa desglucosilada total de los anticuerpos eluidos y se confirma mediante espectrometría de masas con ionización de electrospray (EM-ESI). Resumiendo, se

desglucosilan 100 µg de anticuerpos purificados con 50 mU de N-glucosidasa F (PNGaseF, ProZyme) en 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, de pH 7 a 37°C durante 12-24 h con una concentración de proteína de hasta 2 mg/ml y después se desaliniza por HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). Se determina la masa de las correspondientes cadenas largas y cortas por EM-ESI después de la desglucosilación y reducción. Resumiendo, se incuban 50 µg de anticuerpo en 115 µl con 60 µl de 1M TCEP y 50 µl de clorhidrato de guanidina 8 M y después se desaniliza. Se determina la masa total y la masa de las cadenas largas y cortas reducidas por EM-ESI en un sistema EM Q-Star Elite equipado con una fuente NanoMate.

ELISA de fijación sobre la ANG-1 y la ANG-2

Se evalúan mediante un ensayo ELISA las propiedades de fijación de los anticuerpos dirigidos contra la proteína angiopoyetina-2-His de longitud completa (R&D Systems, n° 623-AN/CF o en material producido en la propia empresa) o contra la angiopoyetina-1-His (R&D Systems, n° 923-AN). Para ello se recubren placas de 96 hoyos (placas de microvaloración mejorada de poliestireno transparente Falcon o Nunc Maxisorb) con 100 µl de 1 µg/ml de angiopoyetina-1 o angiopoyetina-2 recombinantes humanas (sin vehículo) en PBS (Sigma) a temperatura ambiente durante 2 h o a 4°C durante una noche. Se lavan los hoyos tres veces con 300 µl de PBST (0,2% Tween 20) y se bloquean con 200 µl de 2% BSA, 0,1% Tween 20, a temperatura ambiente durante 30 min y después se lavan tres veces con 300 µl de PBST. Se añaden a los hoyos 100 µl/hoyo de una serie de diluciones (40 pM-0,01 pM) de anticuerpo de

ensayo purificado contra la <ANG-2> y, como referencia, un Mab536 (Oliner, J. y col., Cancer Cell. Nov. 6, 507-16, 2004, US-2006/0122370) en PBS y se incuban en un agitador de placas de microvaloración a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavan los hoyos tres veces con 300 µl de PBST (0,2% Tween 20) y se detecta el anticuerpo fijado con 100 µl/hoyo de 0,1 µg/ml de F(ab') <hk>POD (Biozol, n° de cat. 206005) en 2% BSA, 0,1% Tween 20, como anticuerpo de detección, en un agitador de placas de microvaloración a temperatura ambiente durante 1 h. Se elimina por triple lavado el anticuerpo de detección no fijado con 300 µl/hoyo de PBST y se detecta el anticuerpo de detección fijado por adición de 100 µl de ABTS/hoyo. Se efectúa la determinación de la absorbancia en un espectrómetro del tipo Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia: 492 nm).

BIACORE de fijación sobre la ANG-2

Se investiga la fijación de los anticuerpos sobre el antígeno, p.ej. la ANG-2 humana, por resonancia de plasmón de superficie empleando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Upsala, Suecia). Resumiendo, para las mediciones de afinidad se inmovilizan los anticuerpos policlonales de cabra anti<hIgG-Fcγ> sobre un chip CM4 mediante condensación de amina para la presentación de los anticuerpos contra la ANG-2 humana. Se mide la fijación en un tampón HBS (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, de pH 7,4), a 25°C. Se añade en varias concentraciones entre 0,41 nM y 200 nM en solución la ANG-2-His (R&D Systems, o

purificada en la propia empresa). Se mide la asociación por una inyección de la ANG-2 de 3 minutos; se mide la disociación por lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 3 minutos y se estima un valor KD empleando un modelo de fijación 1:1 de Langmuir. Debido al carácter heterogéneo de la preparación de la ANG-2 no se observa fijación 1:1; por tanto, los valores KD son solamente estimaciones relativas. Los datos de control negativo (p.ej. curvas de tampón) se restan de las curvas de muestra para corregir la deriva de la línea de base intrínseco del sistema y para reducir la señal de ruido. Para el análisis de los sensorgramas y para el cálculo de los datos de afinidad se emplea el programa informático Biacore T100 Evaluation Software, versión 1.1.1. Como alternativa, se puede capturar la Ang-2 con un nivel de captura de 2000-1700 RU mediante un anticuerpo penta-His (PentaHis-Ab sin BSA, Qiagen, nº 34660) que se inmoviliza sobre un chip CM5 mediante una condensación de amina (sin BSA) (ver más abajo).

Inhibición de la fijación de la huANG-2 sobre la Tie-2 (ELISA)

Se realiza el ELISA de interacción en placas de microvaloración de 384 hoyos (MicroCoat, DE, nº de cat. 464718) a t.amb. Después de cada paso de incubación se lavan las placas 3 veces con PBST. Se recubren las placas ELISA con 0,5 µg/ml de proteína Tie-2 (R&D Systems, UK, nº de cat. 313-TI) durante por lo menos 2 horas (h). A continuación se bloquean los hoyos con PBS suplementado con 0,2% Tween-20 y 2% BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 1 h. Se incuban las diluciones

de anticuerpos purificados en PBS junto con 0,2 µg/ml de hu-
angiopoyetina-2 (R&D Systems, UK, n° de cat. 623-AN) a t.amb.
durante 1 h. Después de lavar se añade una mezcla de 0,5
µg/ml del clon BAM0981 biotinilado anti-angiopoyetina-2 (R&D
5 Systems, UK) y se añade una dilución 1:3000 de la estrept-
avidina HRP (Roche Diagnostics GmbH, DE, n° de cat.
11089153001) durante 1 h. A continuación se lavan las placas
6 veces con PBST. Se revelan las placas con un reactivo ABTS
recién preparado (Roche Diagnostics GmbH, DE, tampón n° 204
10 530 001, tabletas n° 11 112 422 001) a t.amb. durante 30
minutos. Se mide la absorbancia a 405 nm.

Inhibición de la fijación de la huANG-1 sobre la Tie-2
(ELISA)

Se realiza el ELISA de interacción en placas de micro-
15 valoración de 384 hoyos (MaxiSorb Nunc, n° de cat. 442768) a
t.amb. Después de cada paso de incubación se lavan las placas
3 veces con PBST. Se recubren las placas ELISA con 0,5 µg/ml
de proteína Tie-2 (R&D Systems, UK, n° de cat. 313-TI o mate-
rial producido en la propia empresa) durante por lo menos 2
20 horas (h). A continuación se bloquean los hoyos con PBS su-
plementado con 0,2% Tween-20 y 2% BSA (Roche Diagnostics
GmbH, DE) durante 1 h. Se incuban las diluciones de anti-
cuerpos purificados en PBS junto con 0,2 µg/ml de hu-
angiopoyetina-1 (R&D Systems, UK, n° de cat. 623-AN/CF) a t.
25 amb. durante 1 h. Después de lavar se añade una mezcla de 0,5
µg/ml del clon biotinilado anti-angiopoyetina-1 (R&D Systems,
n° BAF923) y se añade una dilución 1:3000 de la estreptavi-
dina HRP (Roche Diagnostics GmbH, DE, n° de cat. 11089153001)

durante 1 h. A continuación se lavan las placas 6 veces con PBST. Se revelan las placas con un reactivo ABTS recién preparado (Roche Diagnostics GmbH, DE, tampón nº 204 530 001, tabletas nº 11 112 422 001) a t.amb. durante 30 minutos. Se
5 mide la absorbancia a 405 nm.

Generación de la línea celular HEK293-Tie2

Con el fin de determinar la interferencia de los anticuerpos contra la angiopoyetina-2 en la fosforilación de la Tie2 estimulada por la ANGPT2 y la fijación de la ANGPT2
10 sobre la Tie2 en las células se genera una línea celular recombinante HEK293-Tie. Resumiendo, se transfecta un plásmido basado en el pcDNA3 (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) que codifica a la Tie2 humana de longitud completa (SEQ ID 108) bajo el control de un promotor CMV y un marcador de resistencia a la
15 neomicina empleando el Eugene (Roche Applied Science) como reactivo de transfección a las células HEK293 (ATCC) y se seleccionan las células resistentes en DMEM 10 % FCS, 500 µg/ml de G418. Se aíslan los clones individuales en un cilindro de clonación y después se analizan para determinar la expresión
20 de la Tie2 mediante un FACS. Se identifica el clon como el clon que tiene una expresión de Tie2 estable y elevado, incluso en ausencia del G418 (HEK293-Tie2 clon 22). A continuación se emplea el HEK293-Tie2 clon 22 para los ensayos celulares: el ensayo de fosforilación de la Tie2 inducida por
25 la ANGPT2 y el ensayo de fijación de ligando celular sobre la ANGPT2.

Ensayo de fosforilación de la Tie2 inducida por la ANGPT2

La inhibición de la fosforilación de la Tie2 inducida por la ANGPT2 con los anticuerpos contra la ANGPT2 se mide con arreglo al siguiente principio de ensayo. Se estimula el HEK293-Tie2 clon 22 con ANGPT2 durante 5 minutos en ausencia o presencia del anticuerpo contra la ANGPT2 y se cuantifica la P-Tie2 con un ensayo sandwich ELISA. Resumiendo, se cultivan 2×10^5 células HEK293-Tie2 clon 22 por hoyo durante una noche en una placa de microvaloración de 96 hoyos recubierta con poli-D-lisina en 100 μ l de DMEM, 10% FCS, 500 μ g/ml de geneticina. Al día siguiente se prepara una serie de valoraciones de anticuerpos ANGPT2 en una placa de microvaloración (concentración 4 veces mayor, volumen final/hoyo: 75 μ l, duplicados) y se mezclan con 75 μ l de una dilución de ANGPT2 (R&D Systems, n° 623-AN) (3,2 μ g/ml en forma de solución de concentración 4 veces mayor). Se preincuban los anticuerpos y la ANGPT2 a temperatura ambiente durante 15 min. Se añaden 100 μ l de la mezcla a las células del HEK293-Tie2 clon 22 (pre-incubadas durante 5 min con 1 mM NaV3O4, Sigma, n° S6508) y se incuban a 37°C durante 5 min. A continuación se lavan las células con 200 μ l de PBS enfriado con hielo + 1 mM NaV3O4 por hoyo y se lisan por adición de 120 μ l de tampón de lisis (20 mM Tris, pH 8,0, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glicerina, 2 mM EDTA, 1 mM NaV3O4, 1 mM PMSF y 10 μ g/ml de aprotinina) por hoyo sobre hielo. Se lisan las células a 4°C durante 30 min en un agitador de placas de microvaloración y se trasvasan directamente 100 μ l de lisado a la placa de microvaloración ELISA de la p-Tie2 (R&D Systems, R&D n° DY990) sin centrifugación previa y sin

determinación de la proteína total. Se determinan las cantidades de la P-Tie2 con arreglo a las instrucciones del fabricante y se hallan los valores IC50 de inhibición empleando el programa informático de análisis XLfit4 analysis
5 plug-in para Excel (dosis-respuesta, un sitio, modelo 205). Los valores IC50 pueden compararse durante el ensayo, pero pueden variar de un ensayo a otro.

Ensayo de fosforilación de la Tie2 inducida por la
ANGPT1

10 La inhibición de la fosforilación de la Tie2 inducida por la ANGPT1 con los anticuerpos contra la ANGPT1 se mide con arreglo al siguiente principio de ensayo. Se estimula el HEK293-Tie2 clon 22 con ANGPT1 durante 5 minutos en ausencia o presencia del anticuerpo contra la ANGPTa y se cuantifica
15 la P-Tie2 con un ensayo sandwich ELISA. Resumiendo, se cultivan 2×10^5 células HEK293-Tie2 clon 22 por hoyo durante una noche en una placa de microvaloración de 96 hoyos recubierta con poli-D-lisina en 100 μ l de DMEM, 10% FCS, 500 μ g/ml de geneticina. Al día siguiente se prepara una serie de
20 valoraciones de anticuerpos contra la ANGPT1 en una placa de microvaloración (concentración 4 veces mayor, volumen final/hoyo: 75 μ l, duplicados) y se mezclan con 75 μ l de una dilución de ANGPT1 (R&D Systems, n° 923-AN) (0,8 μ g/ml en forma de solución de concentración 4 veces mayor). Se
25 preincuban los anticuerpos y la ANGPT1 a temperatura ambiente durante 15 min. Se añaden 100 μ l de la mezcla a las células del HEK293-Tie2 clon 22 (pre-incubadas durante 5 min con 1 mM NaV304, Sigma, n° S6508) y se incuban a 37°C durante 5 min. A

continuación se lavan las células con 200 µl de PBS enfriado con hielo + 1 mM NaV3O4 por hoyo y se lisan por adición de 120 µl de tampón de lisis (20 mM Tris, pH 8,0, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glicerina, 2 mM EDTA, 1 mM NaV3O4, 1 mM PMSF y 10 µg/ml de aprotinina) por hoyo sobre hielo. Se lisan las células a 4°C durante 30 min en un agitador de placas de microvaloración y se trasvasan directamente 100 µl de lisado a la placa de microvaloración ELISA de la p-Tie2 (R&D Systems, R&D n° DY990) sin centrifugación previa y sin determinación de la proteína total. Se determinan las cantidades de la P-Tie2 con arreglo a las instrucciones del fabricante y se hallan los valores IC50 de inhibición empleando el programa informático de análisis XLfit4 analysis plug-in para Excel (dosis-respuesta, un sitio, modelo 205). Los valores IC50 pueden compararse durante el ensayo, pero pueden variar de un ensayo a otro.

Ejemplo 1

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

Se construyen las cadenas largas y cortas de los correspondientes anticuerpos Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 y Ang2k-LC08 en vectores de expresión del modo antes descrito. Se clona la cadena larga y la cadena corta kappa en un cassette de expresión genómico, mientras que la cadena corta lambda se clona en forma de cDNA con el intrón A (figura 1B). Se amplifican los plásmidos en *E. coli*, se purifican y después se transfectan para la expresión transitoria de las proteínas recombinantes en células HEK293-F (empleando el sistema

FreeStyle 293 de Invitrogen). Pasados 7 días se recolectan los líquidos sobrenadantes que contienen las células HEK 293-F, se filtran y se purifican los anticuerpos por cromatografía de proteína A y de exclusión de tamaños. Se confirma la homogeneidad de todos los anticuerpos por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras y por cromatografía analítica de exclusión de tamaños. En condiciones reductoras (figura 1), las cadenas largas de polipéptidos de los anticuerpos <ANG-2> después de la SDS-PAGE presentan tamaños moleculares aparentes de aprox. 50 kDa, similares a los pesos moleculares calculados; las cadenas cortas de polipéptidos presentan masas moleculares aparentes de 25 kDa acordes con su tamaño previsto. La espectrometría de masas confirma la identidad de los anticuerpos purificados. Los niveles de expresión de todos los constructos se analizan por HPLC de proteína A.

Análisis de cromatografía de exclusión de tamaño del material purificado. Todos los anticuerpos se obtienen y se caracterizan analíticamente de modo similar al procedimiento descrito. Los datos SEC de los anticuerpos correspondientes se recogen en la tabla siguiente.

	cadena de anticuerpo	masa teórica (Da)	masa experimental (Da)	SEC (%) pico pral.
<ANG-2>Ang-2i_LC07	HC	50343	50325 (piro-Glu)	99,7%
	LC	22738	22720 (piro-Glu)	
<ANG-2>Ang-2i_LC06	HC	50343	50325 (piro-Glu)	99,8%

	LC	22620	22605 (piro-Glu)	
<ANG-2>Ang-2k_LC08	HC	49544	49527 (piro-Glu)	99,8%
	LC	22685	22667 (piro-Glu)	

Ejemplo 2

Ensayo ELISA de fijación sobre la ANG-1 y la ANG-2

humanas

La fijación de los anticuerpos <ANG-2> Ang2i-LC06,
5 Ang2i-LC07 y Ang2k-LC08 sobre la ANG-1 y la ANG-2 humanas se
determina en un ensayo ELISA de fijación sobre la ANG-1 o la
ANG-2 del modo descrito anteriormente. Resumiendo, el ensayo
de ELISA se basa en la inmovilización de la angiopoyetina-1 ó
2 humana de tipo salvaje en una placa de microvaloración. Se
10 mide la fijación de un anticuerpo dirigido contra la ANG-1 o
la ANG-2 inmovilizadas mediante un anticuerpo <Fc humano>
(anti-IgG) con un conjugado POD. Una serie de diluciones del
anticuerpo <ANG-2> permite determinar una concentración de
EC50. Como referencia se toma el anticuerpo anti-ANG-2
15 humana, el anticuerpo Mab536 <ANG-2> (Oliner y col., Cancer
Cell. Nov. 6, 507-16, 2004; US 2006/0122370). Las concentra-
ciones EC50 halladas se recogen en la siguiente tabla.

Anticuerpo	fijación a la hANG-1 EC50	fijación a la hANG-2 EC50
<ANG-2>Mab536	2538 ng/ml	133 ng/ml
<ANG-2>Ang2i-LC06	> 8000 ng/ml	84 ng/ml
<ANG-2>Ang2i-LC07	> 8000 ng/ml	3006 ng/ml
<ANG-2>Ang2i-LC08	4044 ng/ml	105 ng/ml

Todos los anticuerpos mencionados se fijan sobre la ANG-2. El MAb536 y el Ang2k-LC08 muestran también una fijación específica sobre la ANG-1, mientras que el Ang2i-LC06 y el Ang2i-LC07 no se unen específicamente a la ANG-1 ya que tienen un valor EC50 superior a 8000 ng/ml (límite de detección).

Ejemplo 3

Fijación sobre la ANG-2 mediante Biacore

Se examina la afinidad de fijación sobre la ANGPT2 humana con un ensayo Biacore del modo antes descrito. Resumiendo, en este ensayo se inmoviliza un anticuerpo captador (anti-Fc) sobre la superficie de un chip Biacore, que captura y presenta al anticuerpo correspondiente (por ejemplo el Ang2i-LC06). Se captura el ligando (en este caso, la ANGPT2) de la solución. Se determina la afinidad de esta interacción suponiendo que se trata de una interacción 1:1. Los detalles de este ensayo se encontrarán en la sección de métodos generales. Se determinan las afinidades de la fijación sobre la ANGPT2 (KD), que se recogen en la tabla siguiente.

hAng-2	ensayo 1			ensayo 2			media (de 1+2)	
	KD (pM)	kd (1/s)	t _(1/2) dis. (min)	KD (pM)	kd (1/s)	t _(1/2) dis. (min)	KD (pM)	t _(1/2) dis. (min)
Ang2i-LC06	11	7,16 x10 ⁻⁵	161	21	1,14 x10 ⁻⁴	102	16	132
Ang2k-LC08	16	1,61 x10 ⁻⁴	72	27	2,28 x10 ⁻⁴	51	22	61

MAb536	29	1,44 $\times 10^{-4}$	80	29	1,25 $\times 10^{-4}$	92	29	86
--------	----	--------------------------	----	----	--------------------------	----	----	----

Los anticuerpos Ang2i-LC06 y Ang2k se fijan sobre la ANGPT2 con mucha afinidad.

Ejemplo 4

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

5 Se demuestra el bloqueo de la interacción de la ANGPT1/2 humanas/ Tie2 humana por un ensayo ELISA DE interacción con el receptor. Se recubren placas Maxisorp (Nunc) de 384 hoyos con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de Tie2 humana (R&D Systems, UK, n° de cat. 313-TI o material producido en la propia empresa) a 10 temperatura ambiente durante 2 h y se bloquean con PBS suplementado con 0,2% de Tween-20 y 2% de BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) a temperatura ambiente durante 1 h con agitación. Paralelamente se incuban las diluciones de los anticuerpos purificados en PBS junto con 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de huAngiopoyetina-1/2 15 (R&D Systems, n° 923-AN/CF, R&D Systems, UK, n° de cat. 623-AN o material preparado en la propia empresa) a t.amb. durante 1 h. Después de lavar una mezcla de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ del clon de anti-Angiopoyetina-1/2 biotinilado (R&D Systems, UK, n° BAF923, BAM0981) y se añade la estreptavidina-HRP diluida 20 1:3000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, n° de cat. 11089153001) durante 1 h. A continuación se lavan las placas 6 veces con PBST. Se revelan las placas con reactivos ABTS recién preparado (Roche Diagnostics GmbH, DE, tampón n° 204 530 001, tabletas n° 11 112 422 001) a t.amb. durante 30. Se mide la 25 absorbancia a 405 nm.

Las concentraciones inhibidoras halladas se recogen en la tabla siguiente.

Anticuerpo	ELISA de interacción ANGPT1/Tie2	ELISA de interacción ANGPT2/Tie2
Ang2i-LC06	> 100 nM	0,1 nM
Ang2k-LC08	11 nM	0,17 nM
MAb536	n.d.	0,15 nM

En la tabla anterior se presentan los diferentes perfiles de selectividad de los dos anticuerpos Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08. El Ang2i-LC06 es selectivo de la ANGPT2, mientras que el Ang2k-LC08 tiene reactividad cruzada con las ANGPT1/2 en un ensayo de inhibición de la interacción ANGPT1/2 Tie2.

Ejemplo 5

Fosforilación de la Tie2

Se examina la capacidad de los anticuerpos anti-ANGPT2 identificados para interferir en la fosforilación de la Tie2 mediada por la ANGPT2 y la ANGPT1 en ensayos de fosforilación de la Tie2 inducida por la ANGPT2 y la ANGPT1 del modo descrito anteriormente. En la figura 3 se incluye una representación esquemática del procedimiento de ensayo.

Tanto el anticuerpo Ang2i-LC06 como el Ang2k-LC08 presentan una interferencia dependiente de la dosis en la fosforilación de la Tie2 estimulada por la ANGPT2 tal como se representa en la figura 4, con valores IC50 comparables. El Ang2i-LC06 interfiere en la fosforilación de la Tie2 estimulada por la ANGPT2 con un valor IC50 de aprox. 508 ng/ml y el Ang2k-LC08 interfiere en la fosforilación de la Tie2 esti-

mulada por la ANGPT2 con un valor IC50 de aprox. 499 ng/ml. En cambio, solamente el Ang2k-LC08 interfiere en la fosforilación de la Tie2 estimulada por la ANGPT1 con un valor IC50 de aprox. 391 ng/ml, mientras que el Ang2i-LC06 no interfiere en la fosforilación de la Tie2 estimulada por la ANGPT2 para el mismo intervalo de concentraciones estudiado (figura 5).

Ejemplo 6

Eficacia "in vivo"

Efecto de los anticuerpos anti-ANGPT en el crecimiento del injerto ajeno de Colo205

Eficacia "in vivo" de los anticuerpos <ANGPT2> Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 frente al Mab536 <ANGPT2> en un modelo de injerto ajeno de Colo205 inyectado por vía subcutánea

Se comparan los anticuerpos purificados Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 con el anticuerpo Mab536 en modelo de injerto ajeno de Colo205 subcutáneo gradual (Ang2_PZ_Colo205_006) en ratones Scid hembras beige.

Anticuerpos: se emplea el Mab536 en forma de solución patrón congelada (c = 4,5 mg/ml), se emplean el Ang2i-LC06 y el Ang2k-LC08 en forma de solución patrón congelada (c = 1 mg/ml) en 20 mM histidina, 140 mM NaCl, pH = 6,0. Se diluye la solución de anticuerpos de forma apropiada en PBS a partir de inyecciones previas del patrón, si fuera necesario, y se aplica el PBS como vehículo. Como control positivo se emplea en anticuerpo anti-IgE IgG1 humanizado Xolair (omalizumab), que se adquiere en la farmacia.

Líneas celulares y condiciones de cultivo: se obtienen originalmente las células de cáncer colorrectal humano

Colo205 de la ATCC y después de la expansión se depositan en el banco celular interno de Roche en Penzberg. Se cultiva la línea celular tumoral de forma habitual en medio RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Austria) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (PAA Laboratories, Austria) y 2 mM L-glutamina, a 37°C en una atmósfera saturada de agua con un 5% de CO₂. Se emplea el pasaje 3 para el trasplante.

Animales: los ratones SCID hembras de color beige (obtenidos de Charles River, Alemania) se mantienen en condiciones específicas, libres de patógenos, con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad, con arreglo a directivas convenidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). Se revisa el protocolo de estudio experimental y se somete a la aprobación del gobierno local. Después de la recepción, los animales se mantienen en la zona de cuarentena de la instalación animal durante una semana, para que se vayan acostumbrando al entorno y para someterlos a observación. Se efectúa un seguimiento continuo de su estado de salud sobre una base regular. Se les facilita pienso (Provimi Kliba 3337) y agua (acidificada a pH 2,5-3) a placer. En el momento de iniciar el estudio, los ratones tienen una edad aproximada de 12-14 semanas.

Seguimiento: se controlan a diario los síntomas clínicos de los animales y se detectan los efectos adversos. Para el seguimiento a lo largo del ensayo se anotan el peso corporal de los animales y se mide con un calibre el volumen del tumor después de la exposición.

Inyección de células tumorales: el día de la inyección se centrifugan las células Colo205, se lavan una vez y se

suspenden de nuevo en PBS. Después de un lavado adicional con PBS se determinan la concentración celular y el tamaño celular empleando un contador de células y un sistema analizador (Vi-CELL, Beckman Coulter). Para la inyección de las células Colo205 se ajusta la concentración final a $5,0 \times 10^7$ células/ml, de una viabilidad aprox. del 90%. A continuación se inyectan por vía s.c. a cada animal 100 μ l de esta suspensión, equivalentes a $2,5 \times 10^6$ células por animal, eligiendo para ello el flanco derecho de los ratones.

10 Tratamiento de los animales: el tratamiento de los animales se inicia el día de su división en grupos aleatorios, 16 días después del trasplante de las células (estudio Ang2_PZ_Colo205_006), con un volumen tumoral medio de 178 mm³.

15 Régimen de dosificación del estudio Ang2_PZ_Colo205_006

grupo	nº de animales	compuesto	dosis (mg/kg)	vía/modo de administración	nº de tratamientos	dosis acumulada (mg/kg)
1	10	vehículo		i.p. una vez por semana	5	
2	10	Xolair	10	i.p. una vez por semana	5	50
3	10	Ang2i-LC06	10	i.p. una vez por semana	5	50
5	10	Ang2k-LC08	10	i.p. una vez por semana	5	50
6	10	MAB536	10	i.p. una vez por semana	5	50

En la figura 6 se representan la inhibición del crecimiento tumoral hasta el día 50. Los datos indican que el anticuerpo Ang2i-LC06 selectivo de la ANGPT2 es el anticuerpo más activo (índice de control tumoral (TCR) = 0,39). El Ang2i-LC06 es más eficaz para inhibir el crecimiento tumoral que el anticuerpo MAb536 (valor TCR = 0,47) y que el

20

anticuerpo Ang2k-LC08 selectivo de la ANGPT2, que reacciona también con la ANGPT1 (valor TCR = 0,46).

Efecto de los anticuerpos anti-ANGPT en el crecimiento del injerto ajeno de KPL-4

5 Eficacia "in vivo" de los anticuerpos <ANGPT2> Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 comparados con el Mab536 <ANGPT2> en un modelo de injerto ajeno de KPL-4 inyectado ortotópico

Se comparan los anticuerpos purificados Ang2i-LC06 y Ang2k-LC08 con el anticuerpo Mab536 en el modelo de injerto
10 ajeno de KPL-4 inyectado ortotópico (Ang2_PZ_KPL-4_002) en ratones Scid hembras de color beige.

Anticuerpos: se emplea el Mab536 en forma de solución patrón congelada (c = 4,5 mg/ml), se emplean el Ang2i-LC06 y el Ang2k-LC08 en forma de solución patrón congelada (c = 1
15 mg/ml) en 20 mM histidina, 140 mM NaCl, pH = 6,0. Se diluye la solución de anticuerpo de modo apropiado en PBS a partir de inyecciones previas del patrón, si fuera necesario, y se aplica PBS como vehículo.

Líneas celulares y condiciones de cultivo: se obtienen
20 originalmente las células KPL-4 de cáncer de mama humano a partir de la efusión pleural maligna de una paciente de cáncer de mama con metástasis inflamatoria cutánea. Las células KPL-4 nos han sido facilitadas gentilmente por el catedrático Prof. J. Kurebayashi (Kawasaki Medical School,
25 Kurashiki, Japón). Se cultivan las células tumorales del modo habitual en medio DMEM (PAN Biotech, Alemania) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (PAN Biotech, Alemania) y 2 mM L-glutamina (PAN Biotech, Alemania) a 37 °C en una atmós-

fera saturada de agua con un 5 % de CO₂. Se realiza el pasaje de cultivo dividiéndolo tres veces/semana con tripsina/EDTA 1x (PAN).

Animales: se mantienen los ratones SCID hembras de color beige (adquiridos a Charles River, Alemania) en condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad, con arreglo a directivas convenidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). Se revisa el protocolo de estudio experimental y se somete a la aprobación del gobierno local. Después de la recepción, los animales se mantienen en la zona de cuarentena de la instalación animal durante una semana, para que se vayan acostumbrando al entorno y para someterlos a observación. Se efectúa un seguimiento continuo de su estado de salud sobre una base regular. Se les facilita pienso (Provimi Kliba 3337) y agua (acidificada a pH 2,5-3) a placer. En el momento de iniciar el estudio, los ratones tienen una edad aproximada de 12-14 semanas.

Seguimiento: se controlan a diario los síntomas clínicos de los animales y se detectan los efectos adversos. Para el seguimiento a lo largo del ensayo se anotan el peso corporal de los animales y se mide con un calibre el volumen del tumor después de la exposición.

Inyección de células tumorales: el día de la inyección se recogen las células tumorales (tripsina-EDTA) de los frascos de cultivo (Greiner TriFlasks) y se transfieren a 50 ml de medio de cultivo, se lavan una vez y se suspenden de nuevo en PBS. Después de un paso adicional de lavado con PBS y filtración (tamiz celular, Falcon™, 100 µm), se ajusta la

concentración celular final a $1,5 \times 10^8/\text{ml}$. Se mezcla cuidadosamente la suspensión de células tumorales con una pipeta de transferencia para evitar la agregación celular. Se realiza la anestesia empleando una unidad inhalativa de Stephen
5 para animales pequeños con cámara de preincubación (plexiglás), máscara inhaladora individual para ratones (silicona) y el compuesto de anestesia isoflurano no inflamable ni explosivo (Pharmacia-Upjohn, Alemania) en un sistema cerrado de circulación. Dos días antes de la inyección se afeita el
10 pelaje de los animales. Para la inyección i.m.f.p. se inyectan las células por vía ortotópica en un volumen de 20 μl ($3 \times 10^6/\text{animal}$) en el penúltimo colchón graso mamario inguinal derecho de cada ratón anestesiado. Para la implantación ortotópica, se inyecta la suspensión celular a través de la
15 piel debajo de la tetilla empleando una jeringuilla microlitro Hamilton y una aguja 30Gx1/2".

El tratamiento de los animales se inicia el día de su división aleatoria en grupos, cuando los tumores alcanzan un tamaño de 60-180 mm $3,35$ días después del trasplante de las
20 células (estudio Ang2_PZ_KPL-4_002) con un volumen tumoral medio de aprox. 90 mm³.

Régimen de dosificación del estudio Ang2_PZ_KPL-4_002

grupo	nº de animales	compuesto	dosis (mg/kg)	vía/modo de administración	nº de tratamientos	dosis acumulada (mg/kg)
1	10	vehículo		i.p. una vez por semana	5	
2	10	Xolair	10	i.p. una vez por semana	5	50
3	10	Ang2i-LC06	10	i.p. una vez por semana	5	50
5	10	Ang2k-LC08	10	i.p. una vez por semana	5	50
6	10	MAB536	10	i.p. una vez por semana	5	50

En la figura 7 se representa la inhibición del crecimiento tumoral hasta el día 64. Los datos indican que el anticuerpo Ang2i-LC06 selectivo de la ANGPT2 es el anticuerpo más eficaz (valor TCR = 0,55) en el modelo KPL-4. El Ang2i-LC06 es más eficaz para inhibir el crecimiento tumoral que el anticuerpo MAb536 (valor TCR = 0,57) y que el anticuerpo Ang2k-LC08 selectivo de la ANGPT2 pero que reacciona también con la ANGPT1 (valor TCR = 0,57).

Ejemplo 7

10 Fijación sobre la ANG-1 mediante un Biacore

Se examina la afinidad de fijación sobre la ANG-1 humana en un ensayo Biacore: se inmoviliza la huAng-1 sobre un chip biosensor CM5 aplicando una reacción química de condensación de amina. Se inyecta la proteína durante 20 min en acetato sódico, pH = 4,5, a razón de 10 µg/ml con un caudal de 5 µl/min. Esto produce una densidad superficial de aprox. 20000 RU. En el flujo celular de referencia se inmoviliza BSA en las mismas condiciones. Se diluyen los anticuerpos en HBS-P hasta 100 nM y se inyectan durante 3 min (fase de asociación). Después de lavar con tampón de trabajo durante 3 min (fase de disociación), se regenera la superficie inyectando hidróxido sódico 10 mM durante 1 min a razón de 5 µl/min. Los resultados se presentan en la figura 8: el Ang2k_LC08 tiene una vida media de disociación de complejo de aproximadamente 50 s, el Ang2i_LC06 de aprox. 5 s y el Ang2i_LC10 no se une a la ANG-1.

Ejemplo 8

Prevención de metástasis/tumores secundarios "in vivo"
en animales que llevan tumores primarios

a) Prevención de metástasis/tumores secundarios en
ratones que se han sometido a un injerto ajeno (xenograft) de
5 tumores Colo205 primarios

Líneas celulares y condiciones de cultivo:

Se obtienen originalmente las células de cáncer colo-
rectal humano Colo205 de la ATCC y después de la expansión
se depositan en el banco celular interno de Roche en Penz-
10 berg. Se cultiva la línea celular tumoral de forma habitual
en medio RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Austria) suplementado
con un 10% de suero fetal bovino (PAA Laboratories, Austria)
y 2 mM L-glutamina, a 37°C en una atmósfera saturada de agua
con un 5% de CO₂. Se emplea el pasaje 3 para el trasplante.

15 Animales:

Los ratones SCID hembras de color beige (obtenidos de
Charles River, Alemania) se mantienen en condiciones
específicas, libres de patógenos, con ciclos diarios de 12 h
de luz/12 h de oscuridad, con arreglo a directivas convenidas
20 (GV-Solas; Felasa; TierschG). Se revisa el protocolo de estu-
dio experimental y se somete a la aprobación del gobierno
local. Después de la recepción, los animales se mantienen en
la zona de cuarentena de la instalación animal durante una
semana, para que se vayan acostumbrando al entorno y para
25 someterlos a observación. Se efectúa un seguimiento continuo
de su estado de salud sobre una base regular. Se les facilita
pienso (Provimi Kliba 3337) y agua (acidificada a pH 2,5-3) a

placer. En el momento de iniciar el estudio, los ratones tienen una edad aproximada de 10 semanas.

Inyección de células tumorales:

El día de la inyección se recogen las células tumorales (tripsina-EDTA) de los frascos de cultivo (Greiner) y se transfieren a 50 ml de medio de cultivo, se lavan una vez y se suspenden de nuevo en PBS. Después de un paso adicional de lavado con PBS y filtración (tamiz celular, Falcon, $\varnothing = 100 \mu\text{m}$), se ajusta la concentración celular final a $2,5 \times 10^7/\text{ml}$. Se mezcla cuidadosamente la suspensión de células tumorales con una pipeta de transferencia para evitar la agregación celular. Se realiza la anestesia empleando una unidad inhalativa de Stephen para animales pequeños con cámara de pre-incubación (plexiglás), máscara inhaladora individual para ratones (silicona) y el compuesto de anestesia isoflurano no inflamable ni explosivo (cp-pharma) en un sistema cerrado de circulación. Dos días antes de la inyección se afeita el pelaje de los animales y para la inyección se levanta cuidadosamente la piel de los animales anestesiados con un fórceps anatómico y se inyectan por vía subcutánea 100 μl de suspensión celular ($= 2,5 \times 10^6$ células) en el flanco derecho de los animales. Se hace el seguimiento del crecimiento de los tumores primarios (datos no presentados).

Seguimiento de tumores secundarios p.ej. en el pulmón por cuantificación de las secuencias Alu humanas

Al término del estudio (día 103) se extraen los pulmones de los animales de todos los grupos. Resumiendo, se transfieren inmediatamente las muestras a nitrógeno líquido.

En un paso posterior se aísla el DNA total de las muestras con un instrumento MagNA Pure LC con arreglo a las instrucciones del fabricante. Se eligen cebadores específicos Alu humanos para la amplificación selectiva de las secuencias Alu por PCR cuantitativa (instrumento LightCycler) (T. Schneider y col., Clin. Exp. Metas. 19, 571-582, 2002).

Tratamiento de los animales

Se inicia el tratamiento de los animales con avastina (10 mg/kg i.p. una vez por semana) 14 días después del trasplante de las células (estudio Ang2_PZ_Colo205_008) en un volumen tumoral promedio de 340 mm³. Pasadas 7 semanas se dividen los ratones aleatoriamente en grupos para el posterior tratamiento secundarios, que se inicia el día 51 con los compuestos que figuran en la siguiente tabla.

Tratamiento secundario, que se inicia el día 51 del estudio Ang2_PZ_Colo205_008.

grupo	nº de animales	compuesto	dosis (mg/kg)	vía/modo de administración	nº de tratamientos	dosis acumulada (mg/kg)
1	10	avastina	10 mg/kg	i.p. una vez por semana	11	110
2	10	LC06 + avastina	10 mg/kg	i.p. una vez por semana	6	60
			10 mg/kg	i.p. una vez por semana	11	110
3	10	LC06	10 mg/kg	i.p. una vez por semana	6	60

En la tabla siguiente se recogen los resultados de la prevención de metástasis/tumores secundarios (en el pulmón), que se representan en la figura 9A

Tabla 1

La cuantificación del DNA ALU humano en los pulmones de ratones que originalmente llevaban tumores Colo205 primarios, después del tratamiento con diferentes anticuerpos

	avastina		avastina + Ang2i-LC06		Ang2i_LC06	
	101	0,0264	201	0,0042	301	0,0047
	102	5,6740	202	0,0044	302	0,0055
	103	0,0307	203	0,0065	303	0,0050
	104	0,0203	204	0,0081	304	0,0064
	105	0,0215	205	0,0063	305	0,0062
	106	0,0338	206	0,0061	306	0,0066
	107	0,0075	207	0,0053	307	0,0250
	108	0,0113	208	0,0506	308	0,0062
	109	0,0087	209	0,0065	309	0,0067
	110	0,0587	210	0,0160	310	0,0064
media		0,5893		0,0114		0,0079
mediana		0,0240		0,0064		0,0063

Los resultados indican una prevención notablemente mejorada de los tumores secundarios/metástasis cuando se compara el ANG2i-LC06 con la avastina.

b) Prevención de la metástasis/tumores secundarios en 5 ratones a los que se ha sometido a un injerto ajeno de tumores KPL-4 primarios

Línea celular tumoral

Se ha definido la línea celular KPL-4 de cáncer de mama humano (células que el catedrático Prof. Kurebayashi nos ha cedido amablemente) a partir de la efusión pleural maligna de una paciente de cáncer de mama con metástasis inflamatoria cutánea. Las células tumorales se cultivan del modo habitual en medio DMEM (PAN Biotech, Alemania) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (PAN Biotech, Alemania) y 2 mM L-

glutamina (PAN Biotech, Alemania) a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con un 5 % de CO₂. Se realiza el pasaje de cultivo dividiéndolo tres veces/semana con tripsina/EDTA 1x (PAN).

5 Ratones

Después de su recepción, se mantienen los ratones SCID hembras de color beige (adquiridos a Charles River, Sulzfeld, Alemania) en la zona de cuarentena de la instalación animal durante una semana, para que se vayan acostumbrando al entorno y para someterlos a observación. Se efectúa un seguimiento continuo de su estado de salud. Se mantienen los ratones en condiciones SPF con arreglo a directivas internacionales (GV-Solas; Felasa; TierschG) con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Se les facilita pienso (Provimi Kliba 3337) y agua (filtrada) a placer. Se revisa el protocolo de estudio experimental y se somete a la aprobación del gobierno local (gobierno de Baviera Superior; n° de registro: 211.2531.2-22/2003).

Inyección de células tumorales

El día de la inyección se recogen las células tumorales (tripsina-EDTA) de los frascos de cultivo (Greiner TriFlask) y se transfieren a 50 ml de medio de cultivo, se lavan una vez y se suspenden de nuevo en PBS. Después de un paso adicional de lavado con PBS y filtración (tamiz celular, Falcon, Ø = 100 µm), se ajusta la concentración celular final a $1,5 \times 10^8$ /ml. Se mezcla cuidadosamente la suspensión de células tumorales con una pipeta de transferencia para evitar la agregación celular. Se realiza la anestesia empleando una

unidad inhalativa de Stephen para animales pequeños con cámara de preincubación (plexiglás), máscara inhaladora individual para ratones (silicona) y el compuesto de anestesia isoflurano no inflamable ni explosivo (Pharmacia-
5 Upjohn, Alemania) en un sistema cerrado de circulación. Dos días antes de la inyección se afeita el pelaje de los animales. Para la inyección i.m.f.p. se inyectan las células por vía ortotópica en un volumen de 20 µl en el penúltimo colchón graso mamario inguinal derecho de cada ratón aneste-
10 siado. Para la implantación ortotópica, se inyecta la suspensión celular a través de la piel debajo de la tetilla empleando una jeringuilla microlitro Hamilton y una aguja 30Gx1/2". Se hace el seguimiento del crecimiento de los tumores primarios (datos no presentados).

15 Seguimiento de los tumores secundarios p.ej. en el pulmón por cuantificación de las secuencias Alu humanas

Al término del estudio (día 103) se extraen los pulmones de los animales de todos los grupos. Resumiendo, se transfieren inmediatamente las muestras a nitrógeno líquido.
20 En un paso posterior se aísla el DNA total de las muestras con un instrumento MagNA Pure LC con arreglo a las instrucciones del fabricante. Se eligen cebadores específicos Alu humanos para la amplificación selectiva de las secuencias Alu por PCR cuantitativa (instrumento LightCycler) (T. Schneider
25 y col., Clin. Exp. Metas. 19, 571-582, 2002).

Tratamiento de los animales

Se inicia el tratamiento de los animales 35 días después del trasplante de las células en un volumen tumoral

promedio de 60-160 mm³. Los compuestos y el régimen de dosificación figuran en la siguiente tabla.

grupo	nº de animales	compuesto	dosis (mg/kg)	vía/modo de administración	nº de tratamientos	dosis acumulada (mg/kg)
4	10	vehículo		i.p. dos veces por semana	5	
5	10	Xolair	10	i.p. dos veces por semana	5	50
6	10	Ang2i_LC06	10	i.p. una vez por semana	4	40
7	10	Ang2i_LC07	10	i.p. una vez por semana	4	40
8	10	Ang2k_LC08	10	i.p. una vez por semana	4	40

En la tabla siguiente se recogen los resultados de la prevención de metástasis/tumores secundarios (en el pulmón),
5 que se representan en la figura 9B

Tabla 2

Cuantificación del DNA ALU humano en los pulmones de ratones que originalmente llevaban tumores KPL4 primarios, después del tratamiento con diferentes anticuerpos

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

mediana	0,0132		0,0192		0,0044		0,0072		0,0051
media	0,0205		0,0246		0,0098		0,0126		0,0086

Los resultados indican una prevención muy eficaz de tumores secundarios/metástasis empleando el ANG2i-LC06, ANG2i-LC07 o ANG2k-LC08.

5 Ejemplo 9

Efectos en el tratamiento de retinopatía

Métodos

Se crían cachorros de C57/Bl6 en diques de cobijo CD1 y se exponen a un 75% de oxígeno desde el P7 al P12 (cámara con control de oxígeno PRO-OX 110, Biospherix Ltd., Redfield, NY), lo cual induce la obliteración vascular y el cese de los capilares en el centro de la retina. Se colocan los cachorros y los diques de cobijo en aire normal, lo cual produce una hipoxia relativa y la inducción de la neovascularización. El día P13 se anestesian los cachorros con isofluorano (5 % para la inducción, 3 % para el mantenimiento, combinado con un 1,5 % de oxígeno), se exponen los ojos y se realizan inyecciones intraoculares de 1 µl empleando una jeringuilla Nanofil provista de una aguja de calibre 35 (WPI, Sarasota, FL) en el ojo izquierdo. El día P17, se diseccionan ambos ojos, se fijan sobre paraformaldehído del 4 % a 4°C durante 4 h y se diseccionan las retinas. Se permeabilizan las retinas en PBS que contiene un 0,5 % de Triton X-100 y 1 % de albúmina de suero bovino, se tiñen con 20 µg/ml de isolectina B4 biotinilada (Sigma Aldrich, Gillingham, UK) en PBS, de pH 6,8, 1% Triton-X100, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mM MgCl₂, y después con 20

ug/ml de ALEXA 488-estreptavidina (Molecular Probes, Eugene, OR) y se montan planas en el Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se analizan por la imagen las retinas empleando un microscopio de epifluorescencia Nikon de 4x aumentos. Se realiza la cuantificación de las zonas neovasculares e isquémicas en modo ciego empleando el Photoshop CS3 junto con Image J (NIH) y se expresan en forma de porcentaje de la superficie total de la retina (= normal + isquémica + neovascular).

10 Resultados

En la figura 10A se muestran retinas representativas montadas planas, cuya vasculatura retinal se visualiza por tinción con isolectina. Las zonas isquémicas del centro inducen la neovascularización y la regeneración de vasos retinales por regulación creciente de los inductores angiogénicos. El frente neovascular es hiperproliferativo, lo cual conduce a vasos tortuosos de un modelo vascular irregular. La mayor parte de las zonas externas contienen los vasos normales no afectados. La cuantificación de los montajes planos de la retina indican que la inhibición del VEGF con avastina reduce la neovascularización retinal (ver figura 10B, del 36,7 $\pm$ 1,8% sin inyectar al 22,4 $\pm$ 3,0% inyectado), como era de esperar. La inhibición de la Ang2 empleando anticuerpos LC06 o LC08 conduce también a una reducción de la neovascularización (del 31,5 $\pm$ 1,1% al 18,8 $\pm$ 1,3% y del 34,0 $\pm$ 3,1% al 25,4 $\pm$ 3,4%). La inyección de control empleando la IgG humana no tiene efecto en la neovascularización (ver figura 10B, del 38,3 $\pm$ 1,1% al 38,3 $\pm$ 0,8%).

TRADUCCION OFICIAL No. 2011-05-23-342
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Caso 25688

Traspaso

Yo/Nosotros, el suscrito(s)

Ulrich Brinkmann, biólogo, ciudadana alemán

Feichtlstrasse 12

D-82362 Weilheim, Alemania

Klaus Kaluza, biólogo, ciudadano alemán

Hochfeldanger 3

D-83670 Bad Heilbrunn, Alemania

Christian Klein, bioquímico, ciudadano alemán

Chruezacherweg 41, CH-8906 Bonstetten Suiza

Joerg Thomas Regula, químico, ciudadano alemán

Lierstrasse 15

D-80639 Muenchen Alemania

Werner Scheuer, bioquímico, ciudadano alemán

Primelstraße 3

D-82377 Penzberg, Alemania

CEDENTE(S), por el presente declaro que soy/somos el inventor(es)
único/conjunto de la invención llamada:

Anticuerpos contra la angiopoyetina 2 humana

para la cual la primera solicitud(es) se presentó así:

<u>País</u>	<u>Fecha de presentación</u>	<u>No. Serial</u>
25688 EP	16.12.2008	08021835.7

y que por una causa contractual adecuada, el recibo y suficiencia de lo cual se reconoce por el presente, yo/nosotros hemos vendido, cedido y transferido todos los derechos y título a y de dicha invención y de dicha solicitud(es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel (Suiza)

Este traspaso es para, pero no se limita a, los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakhstán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Holanda, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sur Africa, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, EE.UU., Venezuela.

En virtud de esta cesión dicho CESIONARIO tiene pleno poder para solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios fines y cuenta PATENTE DE INVENCION en todo el mundo, especialmente en los

países anteriormente nombrados, y a reivindicar el derecho de prioridad de la primera solicitud(es) presentada en el país (países) anteriormente nombrado de acuerdo con las convenciones internacionales.

Se requiere legalización

Firmado en Penzberg, Alemania

el

(firma: ilegible)	Ulrich Brinkmann	28 de julio de 2009
(firma: ilegible)	Klaus Kaluza	18 de agosto de 2009
(firma: ilegible)	Christian Klein	28 de julio de 2009
(firma: ilegible)	Joerg Thomas Regula	31 de julio de 2009
(firma: ilegible)	Werner Scheuer	31 de julio de 2009

Expediente-No. R 1125 / 2009

del 28 de julio de 2009 / ms

Por el presente certifico que el documento adjunto y sellado al presente fue firmado hoy en mi presencia por

- a) Sr. Dr. Ulrich Brinkmann, nacido el 21.02.1961, residente en Fechtlstr. 12, 82362, Weilheim, identificado con su tarjeta de identidad de Alemania,
- b) Sr. Dr. Christian Klein, nacido el 14.07.1972, residente en Moränenweg 5, 82393, Iffeldorf, Weilheim, identificado con su tarjeta de identidad de Alemania,

Penzberg, 28 de julio de 2009

Sello

(firma: ilegible)

Dr. Manfred Reisnecker,

Notario en Weilheim i. OB, República Federal de Alemania

11

Expediente-No. R 1152 / 2009

del 31 de julio de 2009 / ms

Por el presente certifico que el documento adjunto y sellado al presente fue firmado hoy en mi presencia por

Sr. Dr. Jörg Thomas Regula, nacido el 05.04.1971, residente en Lierstr. 15, 80639 München identificado con su tarjeta de identidad de Alemania,

Sr. Dr. Werner Vitus Scheuer, nacido el 10.11.1950, residente en Primelstr. 3, 82377 Penzberg, identificado con su tarjeta de identidad de Alemania.

Penzberg, 31 de julio de 2009

Sello

(firma: ilegible)

Dr. Manfred Reisnecker,

Notario en Weilheim i. OB, República Federal de Alemania

Expediente-No. R 1309 / 2009

del 18 de agosto de 2009 / li

Por el presente certifico que el documento adjunto y sellado al presente fue firmado hoy en mi presencia por

Sr. Dr. Klaus Kaluza, nacido el 10.07.1954, residente en Hochfeldanger 3, 83670 Bad Heilbrunn, identificado con su tarjeta de identidad de Alemania,

Penzberg, 18 de agosto de 2009

Sello

(firma: ilegible)

Dr. Manfred Reisnecker,

Notario en Weilheim i. OB, República Federal de Alemania

DECLARACIÓN

Yo, Dr. Christoph Nertz, Notario Público de Basilea / Suiza, por el presente declaro que esta es una copia fiel del documento original que me ha presentado

F. Hoffmann-La Roche AG

Basilea/Suiza, este día 6 (seis) de noviembre de 2009 (dos mil nueve)

Oblea Notarial

BV 268/2009

(firma: ilegible)

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Suiza
Este documento oficial
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla del anterior nombrado

Certificado

5. en Basilea, Suiza
6. el 9 de noviembre de 2009
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea
8. No. 7706 / 15155
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (ilegible)
Helena Schaffner

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 23 de mayo de 2011, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

Assignment

Beglaubigte Kopie

I/WE, the undersigned

Ulrich Brinkmann, biologist, a German citizen
Feichtlstrasse 12
D-82362 Weilheim, Germany

Klaus Kaluza, biologist, a German citizen
Hochfeldanger 3
D-83670 Bad Heilbrunn, Germany

Christian Klein, biochemist, a German citizen
~~Moraenenweg 5~~ Chruezacherweg 41, CH-8906 Bonstetten, Switzerland
~~D-82393 Iffeldorf, Germany~~

Joerg Thomas Regula, chemist, a German citizen
Lierstrasse 15
D-80639 Muenchen, Germany

Werner Scheuer, biochemist, a German citizen
Primelstrasse 3
D-82377 Penzberg, Germany

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

Antibodies against human Angiopoietin 2

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

<u>Country</u>	<u>Filing date</u>	<u>Serial No.</u>
5688 EP	16.12.2008	08021835.7

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel(Switzerland)

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named countries in accordance with international conventions.

Notarization required

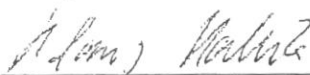
Signed at Penzberg, Germany

on



Ulrich Brinkmann

July 28, 2009



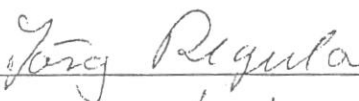
Klaus Kaluza

August 18, 2009



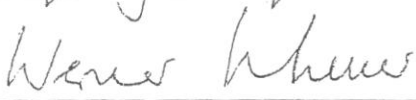
Christian Klein

July 28, 2009



Joerg Thomas Regula

July 31, 2009



Werner Scheuer

July 31, 2009

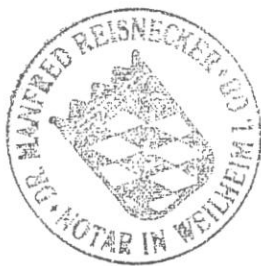
File-No. R 1125/2009

of July 28, 2009 / ms

I hereby certify that the document affixed and sealed hereto was signed today in my presence by

- a) Mr. Dr. Ulrich Brinkmann, born on 21.02.1961, residing at Fechtstr. 12, 82362 Weilheim, identified by his German identity card,
- b) Mr. Dr. Christian Klein, born on 14.07.1971, residing at Moränenweg 5, 82393 Iffeldorf, identified by his German identity card.

Penzberg, July 28, 2009



A handwritten signature in dark ink, appearing to be "Dr. Reisnecker", written over the printed name.

Dr. Manfred Reisnecker,
Notary in Weilheim i. OB, Federal Republic of Germany

File-No. R 1152/2009

of July 31, 2009 / ms

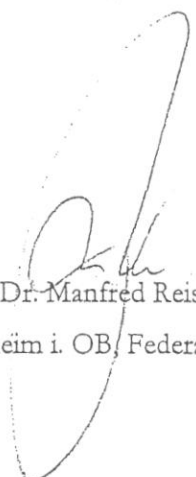
I hereby certify that the document affixed and sealed hereto was signed today in my presence by

Mr. Dr. Jörg Thomas Regula, born on 05.04.1971, residing at Lierstr. 15, 80639 München, identified by his German identity card,

Mr. Dr. Werner Vitus Scheuer, born on 10.11.1950, residing at Primelstr. 3, 82377 Penzberg, identified by his German identity card.

Penzberg, July 31, 2009




Dr. Manfred Reisnecker,

Notary in Weilheim i. OB, Federal Republic of Germany

File-No. R 1309 / 2009

of August 18, 2009 / li

I hereby certify that the document affixed and sealed hereto was signed today in my presence by

Mr. Dr. Klaus Kaluza, born on 10.07.1954, residing at Hochfeldanger 3,
83670 Bad Heilbrunn, identified by his German identity card.

Penzberg, August 18, 2009



Dr. Manfred Reisnecker,
Notary in Weilheim i. OB, Federal Republic of Germany

DECLARATION

I, Dr. Christoph Nertz, Notary public of Basel / Switzerland, herewith declare, that this is a true copy of the original document which has been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG.

B a s e l (Switzerland), this 6th (sixth) day of November 2009 (two thousand and nine).

Dr. Christoph Nertz

BV 268/2009



APOSTILLE	
(Hague Convention of October 5 th , 1961)	
1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)	
This official document	
2. is signed by	<i>Dr. C. N.</i> <i>Chr. Nertz</i>
3. in his/her function as	<i>notary public</i>
4. and certified by the seal of the	<i>above mentioned</i>
Certified -9. Nov. 2009	
5. in Basel (Bâle)	6. on
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. no.	<i>7706/15155</i>
9. Seal / stamp:	10. Signature: <i>[Signature]</i> Helena Schaffner

TRADUCCION OFICIAL No. 2011-05-23-343
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Caso 25688

Traspaso

Nosotros, los suscritos

Remko Albert Griep, Líder de Grupo Expresión y Purificación de Proteínas,
ciudadana holandés

Odalsveien 31B

N-3470 Slemmestad, Noruega

Anita Kavlie, científica principal, ciudadana noruega

Stromsborgveien 39H

N-0287 Oslo, Noruega

CEDENTE(S), por el presente declaro que somos inventor(es) conjunto de la
invención llamada:

Anticuerpos contra la angiopoyetina 2 humana

para la cual la primera solicitud(es) se presentó así:

<u>País</u>	<u>Fecha de presentación</u>	<u>No. Serial</u>
25688 EP	16.12.2008	08021835.7

y que por una causa contractual adecuada, el recibo y suficiencia de lo cual se
reconoce por el presente, yo/nosotros hemos vendido, cedido y transferido todos

los derechos y título a y de dicha invención y de dicha solicitud(es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel (Suiza)

Este traspaso es para, pero no se limita a, los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakhstán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Holanda, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sur Africa, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, EE.UU., Venezuela.

En virtud de esta cesión dicho CESIONARIO tiene pleno poder para solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios fines y cuenta PATENTE DE INVENCION en todo el mundo, especialmente en los países anteriormente nombrados, y a reivindicar el derecho de prioridad de la primera solicitud(es) presentada en el país (países) anteriormente nombrado de acuerdo con las convenciones internacionales.

Se requiere legalización

Firmado en
el

(firma: ilegible)

Remko Albert Griep

(firma: ilegible)

Anita Kavlie

El suscrito Notario Público por el presente certifica que Remko Albert Griep y Anita Kavlie firmaron este documento en mi presencia.

Por favor observe que la confirmación aplica a las firmas únicamente, no a los contenidos del documento.

Oslo byfogdembete, 19 de agosto de 2009

(firma: ilegible)

Pål Davidsen-Homdrom

Førstekonsulent

DECLARACIÓN

Yo, Dr. Christoph Nertz, Notario Público de Basilea / Suiza, por el presente declaro que esta es una copia fiel del documento original que me ha presentado

F. Hoffmann-La Roche AG

Basilea/Suiza, este día 6 (seis) de noviembre de 2009 (dos mil nueve)

Oblea Notarial

BV 270/2009

(firma: ilegible)

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Suiza
Este documento oficial
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla del anterior nombrado

Certificado

- | | |
|--|---|
| 5. en Basilea, Suiza | 6. el 9 de noviembre de 2009 |
| 7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea | |
| 8. No. 7704 / 15153 | |
| 9. Sello/Estampilla | 10. Firma: (ilegible)
Helena Schaffner |

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 23 de mayo de 2011, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO
(JLLCCO: 288705.DOC v.1)4



Assignment

Beglaubigte Kopie

WE, the undersigned

Remko Albert Griep, Group Leader Protein Expression and Purification, a Dutch citizen
Odalsveien 31B
N-3470 Slemmestad, Norway

Anita Kavlie, principal scientist, a Norwegian citizen
Stromsborgveien 39H
N-0287 Oslo, Norway

ASSIGNOR(S), herewith declare that we are joint inventor(s) of the invention entitled:

Antibodies against human Angiopoietin 2

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

<u>Country</u>	<u>Filing date</u>	<u>Serial No.</u>
25688 EP	16.12.2008	08021835.7

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

Affitech Research AS
Gaustadalléen 21
N-0349 Oslo (Norway)
Org. no.: NO 976 567900

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefore the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Notarization required

Signed at

on

Remko

Remko Albert Griep

Anita Kavlie

Anita Kavlie



The undersigned Notary Public hereby certifies that Remko Albert Griep and Anita Kavlie signed this document in my presence.

Please note that the confirmation applies to the signatures only, not to the contents of the document.

Oslo byfogderbete, 19 August 2009

Notary Public
Pål Davidsen-Homdrom
førstekonsulent



DECLARATION

I, Dr. Christoph Nertz, Notary public of Basel / Switzerland, herewith declare, that this is a true copy of the original document which has been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG.

B a s e l (Switzerland), this 6th (sixth) day of November 2009 (two thousand and nine).

Dr. Christoph Nertz

BV 270/2009



APOSTILLE (Hague Convention of October 5 th , 1961)	
1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)	
This official document	
2. is signed by	<i>Dr. iur. Chr. Nertz</i>
3. in his/her function as	<i>notary public</i>
4. and certified by the seal of the	<i>above mentioned</i>
Certified -9. Nov. 2009	
5. in Basel (Bâle)	6. on
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. no. <i>7704/15153</i>	
9. Seal / stamp	10. Signature: <i>[Signature]</i>
	Helena Schaffner

TRADUCCION OFICIAL No. 2011-05-23-344
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Caso 25688

Traspaso

Nosotros, los suscritos

Affitech Research AS
Gaustadalléen 21
N-0349 Oslo, Noruega
Org. No. NO 976 567900

CEDENTE(S), por el presente declaro que somos el co-propietario de la invención
llamada:

Anticuerpos contra la angiopoyetina 2 humana

para la cual la primera solicitud(es) se presentó así:

<u>País</u>	<u>Fecha de presentación</u>	<u>No. Serial</u>
25688 EP	16.12.2008	08021835.7

y que por una causa contractual adecuada, el recibo y suficiencia de lo cual se
reconoce por el presente, yo/nosotros hemos vendido, cedido y transferido todos
los derechos y título a y de dicha invención y de dicha solicitud(es) en todos los
países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La Roche AG

Grenzacherstrasse 124,

CH-4070 Basel (Suiza)

Este traspaso es para, pero no se limita a, los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakhstán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Holanda, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sur Africa, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, EE.UU., Venezuela.

En virtud de esta cesión dicho CESIONARIO tiene pleno poder para solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios fines y cuenta PATENTE DE INVENCION en todo el mundo, especialmente en los países anteriormente nombrados, y a reivindicar el derecho de prioridad de la primera solicitud(es) presentada en el país (países) anteriormente nombrado de acuerdo con las convenciones internacionales.

Se requiere legalización

Firmado en

el

(firma: ilegible)

Martin Welschhof

Director Administrativo Affitech Research AS

CERTIFICACION NOTARIAL

Yo, un Notario Público residente en
por el presente certifico que Martin Welschhof, nacido en
compareció ante mí y firmó el documento anterior en mi presencia

Además certifico que me convencido a mí mismo inspeccionando los documentos
oficiales pertinentes que dicho Martin Welschhof es apoderado general, tiene
facultad para firmar como representante(s) legal de Affitech Research AS.

Notario Público

Cesionario

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel
Suiza

por el presente acepta el traspaso.

Basilea, Suiza, 1 de septiembre de 2009
(Lugar/Fecha)

Firma: (firma: ilegible)	(firma: ilegible)
Antonio Natoli	Dr. Peter Kueng
Titulares del poder	

DECLARACIÓN

Yo, Dr. Christoph Nertz, Notario Público de Basilea / Suiza, por el presente declaro que esta es una copia fiel del documento original que me ha presentado

F. Hoffmann-La Roche AG

Basilea/Suiza, este día 6 (seis) de noviembre de 2009 (dos mil nueve)

Oblea Notarial

BV 269/2009

(firma: ilegible)

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Suiza
Este documento oficial
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla del anterior nombrado

Certificado

5. en Basilea, Suiza
6. el 9 de noviembre de 2009
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea
8. No. 7705 / 15154
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (ilegible)
Helena Schaffner

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 23 de mayo de 2011, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TFYT

2000 MAY 26 A 6:54

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

071152

Anita Escobar
CUIA FUERA AFERCE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Assignment

Beglaubigte Kopie



WE, the undersigned

Affitech Research AS
 Gaustadalléen 21
 N-0349 Oslo, Norway
 Org. no. NO 976 567900

ASSIGNOR(S), herewith declare that we are the co-owner of the invention entitled:

Antibodies against human Angiopoietin 2

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

<u>Country</u>	<u>Filing date</u>	<u>Serial No.</u>
25688 EP	16.12.2008	08021835.7

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
 Grenzacherstrasse 124,
 CH-4070 Basel (Switzerland)

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

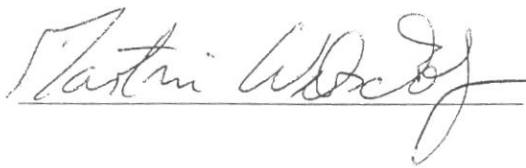
Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefore the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Notarization required

Signed at

on



Martin Welschhof
Managing Director Affitech Research AS

NOTARIAL CERTIFICATION

I

a Notary Public residing at

do hereby certify that
Martin Welschhof
Born

appeared before me and signed the foregoing
document in my presence

I further certify that I have convinced myself by
inspecting the relevant official documents that the
said
Martin Welschhof
Is general proxy holder

has (have) authority to sign as legal representative(s)
of

Affitech Research AS

Notary Public

Assignee

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basle
Switzerland

herewith accepts the assignment.

Basel, Switzerland, September 1, 2009
(Place/Date)

Signature:



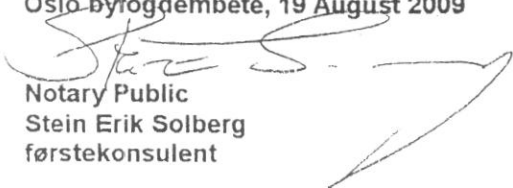
Antonio Natoli



Dr. Peter Kueng

Holders of procuration

The undersigned Notary Public hereby certifies that Martin Welschhof signed this document in my presence, and that he is authorized to sign alone as per power of procuration on behalf of Affitech AS, enterprise number 976567900, according to the Certificate of Registration from the Register of Business Enterprises in Brønnøysund, dated 19 August 2009.
Oslo byfogdembete, 19 August 2009


Notary Public
Stein Erik Solberg
førstekonsulent



DECLARATION

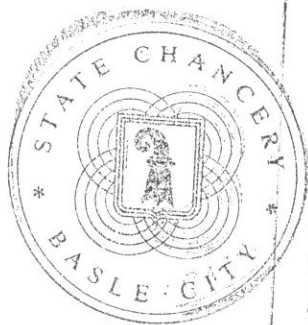
I, Dr. Christoph Nertz, Notary public of Basel / Switzerland, herewith declare, that this is a true copy of the original document which has been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG.

B a s e l (Switzerland), this 6th (sixth) day of November 2009 (two thousand and nine).

Dr. Christoph Nertz

BV 269/2009



APOSTILLE (Hague Convention of October 5 th , 1961)	
1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)	
This official document	
2. is signed by	<i>Dr. Nertz</i>
3. in his/her function as	<i>notary public</i>
4. and certified by the seal of the	<i>above mentioned</i>
5. in Basel (Bâle)	6. on <i>9. Nov. 2009</i>
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. no. <i>7705/15.154</i>	
9. Seal / stamp:	10. Signature <i>[Signature]</i>
Helena Schaffner	