

ANTICUERPOS Ang2**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al campo de la
5 medicina. Más particularmente, la presente invención se
refiere a anticuerpos que se unen a la angiopoyetina-2 humana
(Ang2), y pueden ser útiles para tratar cáncer, especialmente
metástasis del tumor, y en combinación con inhibidores del
receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
10 humano (VEGFR2) para tumores sólidos accionados por el VEGFR2
y Ang2, que incluyen cánceres gástrico, carcinoma
hepatocelular, de ovario, colorrectal, y de mama.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

15 Un sello distintivo del cáncer es la formación
persistente de nuevos vasos sanguíneos, llamada angiogénesis.
La Angiopoyetina-1 (Ang1) y Ang2 son miembros de una
trayectoria clave que regulan la angiogénesis; Ang1 y Ang2
son factores secretados que se unen a la tirosina cinasa Tie2
20 del receptor específico de las células endoteliales. La Ang1
es constitutivamente secretada por pericitos y estabiliza la
integridad de los vasos sanguíneos mediante el receptor Tie2.
La Ang2 es liberada a partir de las células endoteliales
solamente en respuesta al estímulo (por ejemplo,
25 cicatrización de heridas, crecimiento del tumor) y facilita

la brotación de los vasos sanguíneos e inhibe la interacción de células endoteliales del pericito mediante la señalización de Tie2. Los estudios han sugerido que la inhibición de Ang2 es más importante que la Ang1 para inhibir la angiogénesis, pero en ciertos otros estudios, la inhibición de Ang2 y Ang1 ha mostrado beneficios (Cascone et al., J Clin Onc (2012) 30(4):441).

Un anticuerpo contra Ang2 humana, cuando se dosifica en combinación con el aflibercept bloqueador del VEGF, ha sido mostrado por inhibir el crecimiento del tumor y disminuir la vascularidad tumoral en modelos de tumor de injerto heterólogo en ratón (REGN910 en Daly et al., Cancer Res (2013) 73(1):108 y H1H685P en el documento WO2011014469). En Brown et al. (Mol Cancer Ther (2010) 9(1):145), mAb 3.19.3, un anticuerpo Ang2 humano, se reportó por unirse a Ang1 con al menos 500x menos afinidad que Ang2, mientras en los Ejemplos 4 y 9 del documento WO2006068953, el 3.19.3 se describe por los solicitantes por tener fuerte reactividad cruzada para Ang1 con una K_D para Ang2 de aproximadamente 5 pM y una K_D para Ang1 de aproximadamente 30 pM. En un estudio de injerto heterólogo SW620, el 3.19.3 se dosificó en combinación con DC101, un anticuerpo monoclonal que se une a VEGFR2 murino.

Permanece una necesidad para proporcionar anticuerpos alternativos que se inhiben la trayectoria de la

angiogénesis de Ang/Tie2 uniendo la Ang2 humana con alta afinidad y neutralizando la Ang2 humana. En particular, permanece una necesidad para proporcionar anticuerpos que se unen a Ang2 humano con alta afinidad y neutralizan la Ang2 humana, pero no se unen con alta afinidad o neutralizan a Ang1 humano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Por consiguiente, una modalidad de la presente invención proporciona un anticuerpo, que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en donde la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en donde la LCVR tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 3, y la HCVR tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 1.

Ciertos anticuerpos de la presente invención se unen a Ang-2 humano con una alta afinidad que es mayor que los anticuerpos Ang2 humanos conocidos en la técnica. Además, ciertos anticuerpos de la presente invención demuestran una respuesta positiva en modelos de injerto heterólogo del tumor, tales como EL 1997 para cáncer de mama triple negativo, SKOV3x.1 para cáncer de ovario, y PC3 para cáncer de próstata, indicado potencial como un terapéutico del cáncer. Adicionalmente, ciertos anticuerpos de la invención

se unen selectivamente a Ang-2 humano sobre el Ang-1 humano, y evitan las responsabilidades potenciales fuera de objetivo para Ang1 humana.

En una modalidad adicional, la presente invención
5 proporciona un anticuerpo, en donde la LC tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 4, y la HC tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 2.

En una modalidad adicional, la presente invención
proporciona un anticuerpo, que comprende dos cadenas ligeras
10 y dos cadenas pesadas, en donde cada cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 4, y cada cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 2.

En una modalidad adicional, la presente invención
15 proporciona un anticuerpo, en donde una de las cadenas pesadas forma un enlace disulfuro inter-cadena con una de las cadenas ligeras, y la otra cadena pesada forma un enlace disulfuro inter-cadena con la otra cadena ligera, y una de las cadenas pesadas forma dos enlaces disulfuro inter-cadena
20 con la otra cadena pesada.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo, en donde el anticuerpo es glicosilado.

En una modalidad, la presente invención proporciona
25 un anticuerpo que se une a Ang2 humano (SEQ ID NO: 7), que

comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en donde la cadena ligera comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que consisten de las secuencias de aminoácido KASQDVYIAVA (SEQ ID NO: 8), YWASTRDT (SEQ ID NO: 9), y HQYSSYPPT (SEQ ID NO: 10), respectivamente, y en donde la cadena pesada comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que consisten de las secuencias de aminoácido GYSFTDYNMV (SEQ ID NO: 11), YIDPYNGGTGYNQKFEG (SEQ ID NO: 12), y ARTRDRYDVWYFDV (SEQ ID NO: 13), respectivamente.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a Ang2 humano (SEQ ID NO: 7), que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en donde la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en donde la LCVR tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 3, y la HCVR tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 1.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a Ang2 humano (SEQ ID NO: 7), en donde la LC tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 4, y la HC tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 2.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a Ang2 humano (SEQ ID NO: 7), que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en donde cada cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 4, y cada cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 2.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a Ang2 humano (SEQ ID NO: 7), en donde una de las cadenas pesadas forma un enlace disulfuro inter-cadena con una de las cadenas ligeras, y la otra cadena pesada forma un enlace disulfuro inter-cadena con la otra cadena ligera, y una de las cadenas pesadas forma dos enlaces disulfuro inter-cadena con la otra cadena pesada.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a Ang2 humano (SEQ ID NO: 7), en donde el anticuerpo es glicosilado.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención que tiene una constante de equilibrio de disociación, K_D , de menos de aproximadamente 150 pM para Ang2 humano. El anticuerpo de la presente invención es caracterizado además por una velocidad de k_{asoc} a Ag2 humano de aproximadamente $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$. El anticuerpo de la presente invención es caracterizado además por una velocidad de k_{disoc} a Ag2 humano de aproximadamente 0.7

$\times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$. Los valores de K_D , k_{asoc} , y k_{disoc} son establecidos por cinéticas de unión a 37°C como se describe en "Cinéticas de unión, afinidad, y selectividad" en la sección de Ensayos.

El anticuerpo de la presente invención se une a Ag2
5 humano con alta afinidad. Para los propósitos de la presente descripción, el término "alta afinidad" se refiere a una K_D de menos de aproximadamente 150 pM para Ang2 humano. Los valores K_D son establecidos para cinéticas de unión a 37°C como se describe en "Cinéticas de unión, afinidad, y selectividad" en
10 la sección de Ensayos.

En una modalidad, la presente invención proporciona una célula de mamífero, que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ
15 ID NO: 4 y una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2, en donde la célula es capaz de expresar un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4 y una cadena
20 pesada que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.

En una modalidad, la presente invención proporciona un proceso para producir un anticuerpo, que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ
25 ID NO: 4 y una cadena pesada que tiene una secuencia de

aminoácido de la SEQ ID NO: 2, que comprende cultivar una célula de mamífero de la presente invención bajo condiciones de manera que el anticuerpo es expresado, y recuperar el anticuerpo expresado.

5 En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo producido por un proceso de la presente invención.

 En una modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo de
10 la presente invención, y un portador, diluyente o excipiente aceptable.

 En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un
15 anticuerpo de la presente invención. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un anticuerpo de la presente invención, en donde el cáncer es cáncer de
20 mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma hepatocelular. En una modalidad adicional, estos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva del anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes
25 anti-tumorales seleccionados a partir del grupo que consiste

de cisplatino, carboplatino, doxorubicina liposomal, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, partículas unidas a la proteína de paclitaxel para suspensión inyectable, ixabepilona, capecitabina, 5 ramucirumab, FOLFOX (leucovorina, fluorouracilo, y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorina, fluorouracilo, e irinotecano), y cetuximab.

En una modalidad adicional, estos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva del 10 compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes de inmunoncología seleccionados a partir del grupo que consiste de nivolumab, ipilimumab, pidilizumab, pembrolizumab, y durvalumab.

15 En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un anticuerpo de la presente invención. En una modalidad adicional, estos métodos comprenden la 20 administración de una cantidad efectiva del anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes anti-tumorales seleccionados a partir del grupo que consiste de ramucirumab, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, 25 partículas unidas a la proteína de paclitaxel para suspensión

inyectable, ixabepilona, y capecitabina.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de ovario, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una
5 cantidad efectiva de un anticuerpo de la presente invención. En una modalidad adicional, estos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva del anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes anti-tumorales seleccionados
10 a partir del grupo que consiste de ramucirumab, cisplatino, carboplatino, y doxorubicina liposomal.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer gástrico, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una
15 cantidad efectiva de un anticuerpo de la presente invención. En una modalidad adicional, estos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva del anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con ramucirumab.

20 En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar carcinoma hepatocelular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un anticuerpo de la presente invención. En una modalidad adicional, estos métodos comprenden la
25 administración de una cantidad efectiva del anticuerpo de la

presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con ramucirumab.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer colorrectal, que comprende
5 administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un anticuerpo de la presente invención. En una modalidad adicional, estos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva del anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada, o
10 secuencial con uno o más agentes anti-tumorales seleccionados a partir del grupo que consiste de ramucirumab, FOLFOX (leucovorina, fluorouracilo, y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorina, fluorouracilo, e irinotecano), y cetuximab.

En una modalidad, la presente invención proporciona
15 un anticuerpo de la presente invención, para uso en terapia. En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para uso en el tratamiento de cáncer. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente
20 invención, para uso en el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma hepatocelular. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer, el anticuerpo de la presente invención en combinación
25 simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes

anti-tumorales seleccionados a partir del grupo que consiste de cisplatino, carboplatino, doxorubicina liposomal, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, partículas unidas a la proteína de paclitaxel para
5 suspensión inyectable, ixabepilona, capecitabina, ramucirumab, FOLFOX (leucovorina, fluorouracilo, y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorina, fluorouracilo, e irinotecano), y cetuximab.

En una modalidad adicional, para uso en el
10 tratamiento de cáncer, el compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes de inmuno-oncología seleccionados a partir del grupo que consiste de nivolumab, ipilimumab, pidilizumab, pembrolizumab, y durvalumab.

15 En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para uso en el tratamiento de cáncer de mama. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer de mama, el anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada,
20 o secuencial con uno o más agentes anti-tumorales seleccionados a partir del grupo que consiste de ramucirumab, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, partículas unidas a la proteína de paclitaxel para suspensión inyectable, ixabepilona, y capecitabina.

25 En una modalidad, la presente invención proporciona

un anticuerpo de la presente invención, para uso en el tratamiento de cáncer de ovario. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer de ovario, el anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada, 5 o secuencial con uno o más agentes anti-tumorales seleccionados a partir del grupo que consiste de ramucirumab, cisplatino, carboplatino, y doxorubicina liposomal.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para uso en el 10 tratamiento de cáncer gástrico. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer gástrico, el anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con ramucirumab.

En una modalidad, la presente invención proporciona 15 un anticuerpo de la presente invención, para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular, el anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con 20 ramucirumab.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para uso en el tratamiento de cáncer colorrectal. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer colorrectal, 25 el anticuerpo de la presente invención en combinación

simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes anti-tumorales seleccionados a partir del grupo que consiste de ramucirumab, FOLFOX (leucovorina, fluorouracilo, y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorina, fluorouracilo, e 5 irinotecano), y cetuximab.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo de la presente invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer. En una modalidad adicional, la presente invención 10 proporciona el uso de un anticuerpo de la presente invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma hepatocelular.

En una modalidad adicional, la presente invención 15 proporciona el uso de un anticuerpo de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes anti-tumorales seleccionados a partir del grupo que consiste de cisplatino, carboplatino, doxorubicina liposomal, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, 20 navelbina, eribulina, partículas unidas a la proteína de paclitaxel para suspensión inyectable, ixabepilona, capecitabina, ramucirumab, FOLFOX (leucovorina, fluorouracilo, y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorina, 25 fluorouracilo, e irinotecano), y cetuximab para la

manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

Un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de polipéptido que no se origina naturalmente diseñado por ingeniería. Una molécula de ADN de la presente
5 invención es una molécula de ADN que no se origina naturalmente que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de uno de los polipéptidos en un anticuerpo de la presente invención.

10 Un anticuerpo de la presente invención es diseñado para tener CDRs diseñadas por ingeniería y tener algunas porciones del anticuerpo (todas o partes de las armazones, regiones de articulación, y regiones constantes) por ser de origen humano que son idénticas con o sustancialmente
15 idénticas (sustancialmente humanas) con armazones y regiones constantes derivadas de secuencias genómicas humanas. Armazones completamente humanos, regiones de articulación, y regiones constantes son aquellas secuencias de línea germinal humana así como también secuencias con mutaciones somáticas
20 que se originan naturalmente y aquellas con mutaciones diseñadas por ingeniería. Un anticuerpo de la presente invención puede comprender regiones de armazón, articulación, o constantes derivadas de una región de armazón, articulación o constante completamente humana, que contiene una o más
25 sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácido. Además,

un anticuerpo de la presente invención es preferiblemente sustancialmente no inmunogénico en humanos.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de tipo IgG y tiene cuatro cadenas de aminoácido
5 (dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras") que son reticuladas mediante enlaces disulfuro intra e inter-cadena. Cada cadena pesada está comprendida de una HCVR N-terminal y una región constante de cadena pesada ("HCCR"). Cada cadena ligera está comprendida de una LCVR y una región constante de
10 cadena ligera ("LCCR"). Cuando se expresa en ciertos sistemas biológicos, los anticuerpos que tienen las secuencias Fc humanas nativas son glicosilados en la región Fc. Típicamente, la glicosilación ocurre en la región Fc del anticuerpo en un sitio de N-glicosilación altamente
15 conservado. Los N-glicanos típicamente se unen a asparagina. Los anticuerpos pueden ser glicosilados en otras posiciones también.

Opcionalmente, el anticuerpo de la presente invención contiene una porción Fc la cual se deriva de la
20 región Fc de IgG₄ humano debido a una capacidad reducida para acoplar los mecanismos inflamatorios mediados por el receptor Fc o para activar el complemento resultante en la función efectora reducida.

Además, ciertos anticuerpos de la presente
25 invención contienen una porción Fc de IgG₄-PAA. La porción Fc

de IgG₄-PAA Fc tiene una mutación de serina a prolina en la posición 229, una mutación de fenilalanina a alanina en la posición 235, y una mutación de leucina a alanina en la posición 236. La mutación S229P es una mutación de articulación que previene la formación de semi-anticuerpo (fenómeno de intercambio dinámico de semi-moléculas en anticuerpos IgG₄). Las mutaciones F235A y L236A reducen además la función efectora del isotipo IgG₄ humano ya bajo.

Las regiones HCVR y LCVR pueden ser además subdivididas en regiones de hiper-variabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad ("CDRs"), intercaladas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones de armazón ("FR"). Cada HCVR y LCVR está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, arregladas del término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Aquí, las tres CDRs de la cadena pesada son referidas como "HCDR1, HCDR2, y HCDR3" y las tres CDRs de la cadena ligera son referidas como "LCDR1, LCDR2 y LCDR3". Las CDRs contienen la mayoría de los residuos los cuales forman interacciones específicas con el antígeno. Existen actualmente tres sistemas de asignaciones de CDR para anticuerpos que son usados para la delineación de secuencia. La definición de CDR de Kabat (Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) se basa en la variabilidad de

la secuencia del anticuerpo. La definición de CDR de Chothia (Chothia *et al.*, "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani *et al.*, "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) se basa en las estructuras tri-dimensionales de anticuerpos y topologías de los bucles de CDR. Las definiciones de CDR de Chothia son idénticas a las definiciones de CDR de Kabat con la excepción de HCDR1 y HCDR2. La definición de CDR de North (North *et al.*, "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) se basa en el agrupamiento de propagación de afinidad con un gran número de estructuras cristalinas.

Para los propósitos de la presente invención, se usa una combinación de los tres métodos para definir las CDRs. En el caso de las CDRs de cadena ligera, se usan las definiciones de CDR de North. En el caso de HCDR1, se usa un híbrido de las definiciones de CDR de Kabat y Chothia. La definición de Kabat de HCDR1 inicia en el noveno residuo después de la primera cisteína de la cadena pesada y es típicamente de cinco a siete residuos de longitud, mientras la definición de Chothia de HCDR1 inicia en el cuarto residuo después de esta cisteína y es típicamente de siete a nueve

residuos de longitud. La HCDR1 del anticuerpo de la presente invención se define por la posición de inicio de Chothia y la posición de término de Kabat. En el caso de HCDR2, se usa la definición de CDR de Kabat. En el caso de HCDR3, se usa un

5 híbrido de las definiciones de CDR de North, Kabat y Chothia. La definición de Kabat de HCDR3 comprende los residuos 99-110 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 2 para el anticuerpo de la presente invención) y típicamente inicia tres residuos después de una cisteína. La definición de Chothia para HCDR3

10 es la misma como la definición de Kabat. La definición de North de HCDR3 comprende los residuos 97-110 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 2 para el anticuerpo de la presente invención) y típicamente inicia inmediatamente después del residuo cisteína. La HCDR3 del anticuerpo de la presente

15 invención se define por la posición de inicio de North y la posición de término de Kabat/Chothia/North.

Un ADN aislado que codifica una región de HCVR puede ser convertido a un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operablemente el ADN que codifica a la

20 HCVR a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada. Las secuencias de genes de regiones constantes de cadena pesada humanos, así como de otros mamíferos, se conocen en la técnica. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener *por ejemplo*,

25 por amplificación de PCR estándar.

Un ADN aislado que codifica una región de LCVR puede ser convertido a un gen de cadena ligera de longitud completa enlazando operablemente el ADN que codifica a LCVR con otra molécula de ADN que codifica una región constante de
5 cadena ligera. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera, humano, así como también de otros mamíferos, se conocen en la técnica. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una
10 región constante kappa o lambda.

Los polinucleótidos de la presente invención serán expresados en una célula hospedera después que las secuencias han sido operablemente ligadas a una secuencia de control de expresión. Los vectores de expresión son típicamente
15 replicables en los organismos hospederos ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosomal del hospedero. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina, y dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de estas
20 células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

El anticuerpo de la presente invención puede fácilmente ser producido en células de mamífero tales como células CHO, NS0, HEK293 o COS. Las células hospederas son cultivadas usando técnicas bien conocidas en el arte.

25 Los vectores que contienen las secuencias de

polinucleótido de interés (por ejemplo, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos del anticuerpo y las secuencias de control de expresión) pueden ser transferidos en la célula hospedera por métodos bien conocidos, los cuales
5 varían dependiendo del tipo de hospedero celular.

Varios métodos de purificación de proteína pueden ser empleados y tales métodos se conocen en la técnica y describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) y Scopes, *Protein Purification: Principles*
10 *and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

En otra modalidad de la presente invención, el anticuerpo, o los ácidos nucleicos que codifican los mismos, se proporciona en la forma aislada. Como se usa en la presente, el término "aislado" se refiere a una proteína,
15 péptido, o ácido nucleico el cual está libre o sustancialmente libre de cualquiera de otras especies macromoleculares encontradas en un ambiente celular. "Sustancialmente libre" como se usa en la presente significa la proteína, péptido, o ácido nucleico de interés que
20 comprende más de 80% (en una base molar) de las especies macromoleculares presentes, preferiblemente más de 90%, y más preferiblemente más de 95%.

El anticuerpo de la presente invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo, pueden
25 ser administrados por rutas parenterales (por ejemplo,

subcutánea e intravenosa). Un anticuerpo de la presente invención puede ser administrado a un paciente solo o con portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables en dosis únicas o múltiples. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser preparadas por métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.) y comprenden un anticuerpo, como se describe en la presente, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término "tratar" (o "trata" o "tratamiento") se refiere a alentar, interrumpir, detener, aliviar, detener, reducir o invertir el progreso o severidad de un síntoma, trastorno, condición, o enfermedad existente.

"Se une" como se usa en la presente con referencia a la afinidad de un anticuerpo para Ang2 humano se pretende por significar, a menos que se indique de otro modo, una K_D de menos de aproximadamente 1×10^{-8} M, preferiblemente, menos de aproximadamente 1×10^{-9} M como se determina por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo por el uso de un biosensor de resonancia de plasmón de superficie (SPR) a 25°C o 37°C esencialmente como se describe en la presente. El término "selectivo" o "selectividad" usado en la presente con referencia a un compuesto de la presente invención se refiere

a un compuesto que se une a un objetivo, tal como Ang2 humano, con una K_D de aproximadamente 1000-, 500-, 200-, 100-, 50-, o aproximadamente 10-veces inferior que el compuesto se une a otras proteínas, que incluye miembros de la familia objetivo tales como Ang1 humano, como se mide por la resonancia de plasmón de superficie a 25°C o 37°C. Adicionalmente, o alternativamente, un anticuerpo selectivo de Ang2 de la presente invención se une a Ang2 humano pero no se une o solamente se une mínimamente a Ang1 humano cuando se somete a ensayo por los métodos descritos en los Ejemplos de la presente abajo.

"Cantidad efectiva" significa la cantidad de un anticuerpo de la presente invención o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de o un efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o humano que está siendo buscado por el investigador, doctor médico, u otro especialista. Una cantidad efectiva del anticuerpo puede variar de conformidad con los factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para estimular una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad efectiva es también una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo es ponderado por los efectos terapéuticamente benéficos.

Esta invención es además ilustrada por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Expresión y purificación del anticuerpo

5 Los polipéptidos de las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera, las secuencias de aminoácido de cadena ligera y cadena pesada completas del Anticuerpo A, y las secuencias de nucleótido que codifican las mismas, son listadas abajo en la sección titulada "Aminoácido y
10 Secuencias de Nucleótido." Además, las SEQ ID NOs para la cadena ligera, cadena pesada, región variable de cadena ligera, y región variable de cadena pesada del Anticuerpo A se muestran en la Tabla 1.

Los anticuerpos de la presente invención, que
15 incluyen, pero no se limitan a, Anticuerpo A, pueden ser elaborados y purificados esencialmente como sigue. Una célula hospedera apropiada, tal como HEK 293 o CHO, puede ser ya sea temporalmente o establemente transfectada con un sistema de expresión para secretar anticuerpos usando una relación de
20 vector HC:LC predeterminada óptima (tal como 1:3 o 1:2) o un sistema de vector único que codifica tanto HC como LC. El medio clarificado, en el cual el anticuerpo ha sido secretado, puede ser purificado usando cualquiera de muchas técnicas comúnmente usadas. Por ejemplo, el medio puede ser
25 convenientemente aplicado a una columna MabSelect (GE

Healthcare), o columna KappaSelect (GE Healthcare) para el fragmento de Fab, que ha sido equilibrado con un amortiguador compatible, tal como salina amortiguada de fosfato (pH 7.4). La columna puede ser lavada para remover componentes de unión no específicos. El anticuerpo unido puede ser eluido, por ejemplo, por gradiente de pH (tal como 20 mM de amortiguador Tris a pH 7, a 10 mM de amortiguador de citrato de sodio a pH 3.0, o salina amortiguada de fosfato a pH 7.4 a 100 mM de amortiguador de glicina a pH 3.0). Las fracciones de anticuerpo pueden ser detectadas, tal como por SDS-PAGE, y después pueden ser combinadas. La purificación adicional es opcional, dependiente del uso propuesto. El anticuerpo puede ser concentrado y/o filtrado estéril usando técnicas comunes. Los agregados solubles y multímeros pueden ser efectivamente removidos por técnicas comunes, que incluyen exclusión de tamaño, interacción hidrofóbica, intercambio iónico, multimodal, o cromatografía de hidroxapatito. La pureza del anticuerpo después de estas etapas de cromatografía es mayor de 95%. El producto puede ser inmediatamente congelado a -70°C o puede ser liofilizado.

Tabla 1: SEQ ID NOS

	Anticuerpo A
HCVR	1
LCVR	3
Cadena pesada	2
Cadena ligera	4

Ensayos

Cinéticas de unión, afinidad, y selectividad

Las cinéticas de unión, afinidad, y selectividad para especies múltiples de Ang2 soluble tales como humano, cinomólogo, ratón, conejo y perro, pueden ser determinada para anticuerpos de la presente invención a 25°C o 37°C por el uso de un biosensor de resonancia de plasmón de superficie (SPR) tal como un BIAcore® 2000, BIAcore® 3000, o a BIAcore® T100 (GE HealthCare) de conformidad con métodos conocidos en la técnica.

El Ang2 humano puede ser adquirido de R&D Systems. La superficie de la Proteína A para captura de anticuerpos puede ser preparada usando los siguientes métodos. La inmovilización de la Proteína A soluble (Calbiochem, Cat: 539202) en un CM4 (Biacore #BR-1005-34) o CM5 (Biacore #BR-1000-99) puede ser preparada usando un método de acoplamiento de amina EDC/NHS (Biacore # BR-1000-50). Brevemente, las superficies de todas las cuatro células de flujo pueden ser activadas inyectando una mezcla 1:1 de EDC/NHS por siete minutos a 5 µl/min o 10 µL/min. Después de lo cual, la proteína soluble A puede ser diluida en 10 mM de amortiguador de acetato, pH 4.5, e inmovilizada por siete minutos sobre células de flujo (Fc) 2, 3 o 4 a una velocidad de flujo de 5 µL/min o 10 µL/min. Los sitios sin reaccionar que permanecen en la superficie del chip pueden ser bloqueados con una

inyección de siete minutos de etanolamina a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ o 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. El amortiguador de corrida puede ser HBS-EP+ (Biacore # BR-1006-69). Las muestras de anticuerpo pueden ser preparadas a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por dilución en amortiguador de corrida. Las concentraciones discretas de ligandos de Ang2 que varían desde 200 nM hasta 3.1 nM pueden ser preparadas usando una dilución serial de dos veces en amortiguador de corrida. Cada ciclo de análisis puede consistir de una serie de cinco etapas separadas: (1) captura de anticuerpo en células de flujo separadas (Fc2, Fc3, y Fc4), (2) inyección (usando kinject) de 250 μL (300-segundos de tiempo de contacto de superficie) de concentraciones discretas de Ang2 sobre todo el Fc a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, (3) regreso a flujo amortiguador por 20 minutos para monitorear la fase de disociación, (4) regeneración de superficies de fragmento con una inyección de 10 μL (30-segundos de tiempo de contacto) de 10 mM de glicina, pH 1.5, (5) equilibrio de la superficie del chip con una inyección de 15 μL (45-segundos de tiempo de contacto) de amortiguador de corrida HBS-EP+. Los datos resultantes pueden ser procesados usando dobles referencias estándares y ajustados a un modelo de unión 1:1 usando software de Evaluación Biacore 2000, versión 4.1, para determinar la velocidad de asociación (k_{asoc} , unidades $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), velocidad de disociación (k_{disoc} , unidades s^{-1}). El cálculo de la constante de disociación de equilibrio (K_D) puede ser

calculado a partir de la siguiente relación, $K_D = k_{asoc}/k_{disoc}$, y se presenta en unidades molares.

H1H685P-293HEK es un anticuerpo Ang2 IgG1 humano expresado en células 293 HEK que utiliza una secuencia de HCVR (SEQ ID NO: 18 del documento WO2011014469) y una secuencia de LCVR (SEQ ID NO: 20 del documento WO2011014469).
 3.19.3-293HEK es un anticuerpo IgG1 humano expresado en células 293 HEK que se unen a Ang2 y utiliza la secuencia de HCVR 3.19.3 (SEQ ID NO: 2 del documento WO2009097325) y la secuencia de LCVR MEDI1 (SEQ ID NO: 3 del documento WO2009097325).

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Anticuerpo A se une a Ag2 humano con una K_D de aproximadamente 4x y 8x inferior que H1H685P-293HEK y 3.19.3-293HEK, respectivamente (Tabla 2).

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Anticuerpo A se une a Ang2 humano, cinomólogo, de ratón, conejo y perro con afinidades de 80, 107, 109, 210 y 140 pM, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 2

Parámetros de Biacore SPR para Unión a hAng2 (25°C)			
	K_{asoc} (10^5 1/Ms)	K_{disoc} (10^{-4} 1/s)	K_D (pM)
H1H685P-293HEK	1.06	0.20	185
Anticuerpo A	7.47	0.28	38
3.19.3-293HEK	2.44	0.80	330

Tabla 3

Parámetros de Anticuerpo A Biacore SPR para Unión a Ang2 (37°C, n=3)			
	K_{asoc} (1/MS)	K_{disoc} (1/s)	K_D (pM)
Ang2 humano	$1.0 (\pm 0.4) \times 10^6$	$0.7 (\pm 0.2) \times 10^{-4}$	80 ± 50
Ang2 cino	$2.7 (\pm 0.2) \times 10^6$	$2.9 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	107 ± 6
Ang2 ratón	$1.0 (\pm 0.2) \times 10^6$	$1.1 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	109 ± 9
Ang2 conejo	$7.3 (\pm 1.9) \times 10^5$	$1.5 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	210 ± 40
Ang2 perro	$7.9 (\pm 3.2) \times 10^5$	$1.1 (\pm 0.4) \times 10^{-4}$	140 ± 10
Ang2 rata	$1.2 (\pm 0.04) \times 10^6$	$2.0 (\pm 0.2) \times 10^{-4}$	180 ± 20

Medición de afinidad con Kinexa

Un instrumento KinExA 3200 (Sapidyne Inst. Inc.) puede ser usado para medir las cinéticas de unión. Brevemente, el Ang2 humano puede ser covalentemente acoplado a perllillas de sefarosa y la unión de Mab libre a las perllillas puede ser detectada en el KinExA 3200. Para medir la K_D , tubos individuales que contienen Mab (1 pM, 2 pM, o 5 pM) con disminución de Ang2 humano serialmente diluido pueden ser incubados por algunos días a 25°C en PBS que contiene 1mg/ml de BSA. Después de la incubación, el Mab libre en cada muestra equilibrada puede ser determinado. Los valores K_d pueden ser determinados usando análisis de curva-N con software KinExA.

En experimentos realizados esencialmente como se

describe en este ensayo, el Anticuerpo A se une a Ag2 humano con a K_D aproximadamente 8x inferior que H1H685P-293HEK (Tabla 4).

Tabla 4

5	Anticuerpo	K_D (pM)	95% de intervalo de confianza
	Anticuerpo A	0.11 pM	<0.0004 pM - 0.56 pM
	H1H685P-293HEK	0.87 pM	0.15 pM - 2.2 pM

El Anticuerpo A inhibe la interacción de Ang2 humano a Tie2 humano mediante un ensayo de ELISA de fase sólida

El bloqueo de unión de Ang2 humano a su Tie2 humano del receptor por un anticuerpo de la presente invención puede ser medido en un ensayo ELISA *in vitro* de fase sólida.

Para el ensayo, placas ELISA de 96 cavidades de alta unión (Costar #2592) pueden ser recubiertas con 4 μ g/ml (en 100 μ l) de Tie2-Fc humano recombinante (R&D Systems #313-TI), durante la noche a temperatura ambiente. Las placas pueden ser lavadas 3X con TBST (salina amortiguada de Tris que contiene 0.05% de Tween 20) y después pueden ser bloqueadas con 300 μ l/cavidad de amortiguador de bloqueo (0.5% de BSA/D-PBS) (BSA: Jackson ImmunoResearch #001-000-162; libre de IgG, libre de proteasa) por 1-2 horas a temperatura ambiente en un sacudidor orbital. Durante la etapa de bloqueo, en placas de cavidades múltiples de

polipropileno separadas, 75 µl de anticuerpos de prueba 2X (serialmente diluido 1:3 en amortiguador de bloqueo) pueden ser agregadas con 75 µl de Ang2 humano biotinilado 2X (R&D Systems #BT623) (también diluido en amortiguador de bloqueo).

5 Las mezclas de Ang2 de anticuerpo/biotiniladas pueden entonces ser removidas a partir de las placas de ELISA recubiertas con Tie2-Fc, después de lo cual 50 µl por cavidad de las mezclas de Ang2 de anticuerpo/biotiniladas pueden ser agregados (en cavidades duplicadas). Las placas pueden

10 entonces ser incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, cubiertas con selladores de placa, en un sacudidor orbital. Las placas pueden entonces ser lavadas 3X, después de lo cual pueden ser agregados 100 µl por cavidad de estreptavidina-HRP (R&D Systems #DY998, pueden ser diluidas

15 1:200 en amortiguador de bloqueo). Las placas entonces pueden ser incubadas por 45 minutos a temperatura ambiente, cubiertas con selladores de placa, en un sacudidor orbital. Las placas pueden entonces ser lavadas nuevamente 3X.

Las placas pueden entonces ser desarrolladas

20 agregando 100 µl por cavidad de un sustrato TMB de un componente (pueden ser calentadas a temperatura ambiente) (Surmodics/BioFX Labs #TMBW-1000-01). El desarrollo puede ser permitido para progresar por 10 minutos a temperatura ambiente (las placas pueden ser cubiertas con papel

25 aluminio). El desarrollo puede ser detenido con 100 µl por

cavidad de solución de detención de ácido (solución de detención TMB, Surmodics/BioFX Labs #LSTP-1000-01). Las placas pueden ser mezcladas en un sacudidor orbital después de que son leídas a 450 nm en un lector ELISA (Molecular
5 Devices SpectraMax 190), usando software SOFTmax PRO 5.4.1 (Molecular Devices Corp.). Los valores A450 reflejan la cantidad de Ang2 biotinilado que permanece unido a Tie-2-Fc. La reducción de los valores A450 refleja el bloqueo de Ang2 biotinilado que se une a Tie-2-Fc.

10 Los valores IC₅₀ para inhibición de unión de Ang2 a Tie-2 pueden ser calculados en GraphPad Prism 6, usando valores X Log-transformados. Análisis de regresión lineal (ajuste de curva) (respuesta de dosis sigmoidal, inclinación disponible), puede ser realizado en los datos log-
15 transformados para obtener valores IC₅₀. Si se realiza un experimento más de una vez, el valor IC₅₀ de la media geométrica (y 95% de intervalo de confianza) entre los experimentos puede ser calculado.

En experimentos realizados esencialmente como se
20 describe en este ensayo, el Anticuerpo A bloquea específicamente la unión de Ang2 a Tie-2 en una manera dependiente de la dosis, resultando en un valor IC₅₀ de media geométrica (n=2) de 0.027 nM (95% de intervalo de confianza 0.00089 - 0.8029 nM). El anticuerpo A y H1H685P-293HEK tiene
25 valores de IC₅₀ de neutralización comparables.

Neutralización de fosforilación inducida por Ang2 de Tie-2 pero no fosforilación mediada por Ang1.

La inhibición a base de células *in vitro* de Tie-2 humano por un anticuerpo de la presente invención puede ser medida en un ensayo a base de células donde Ang1 y Ang2 se unen a, e inducen fosforilación de Tie-2 humana en una manera dependiente de la dosis. El ensayo a base de células *in vitro* puede ser usado para evaluar la capacidad del Anticuerpo A para neutralizar selectivamente la fosforilación mediada por Ang2 y no Ang1 del receptor Tie-2 en una manera dependiente de la dosis. Un anticuerpo Ang2, un anticuerpo reactivo cruzado Ang1/2, y un anticuerpo de isotipo PAA de IgG4 humano de control pueden ser incluidos como controles positivos y negativos, respectivamente.

La línea de células CHO-Tie-2 puede ser generada por transfección estable de un receptor Tie-2 humano de longitud completa (con una etiqueta FLAG 3X en el C-término). Las células CHO-Tie-2 pueden ser mantenidas en medio completo de Hams F-12 (CellGro/Mediatech #10-080-CV), 10% de FBS inactivado con calor (Life Technologies/Invitrogen #10082-147), 1X de antibiótico-antimicótico (Life Technologies/Invitrogen #15240-062), 1.25 mg/ml de G418 (Corning Cellgro #30-234-CI), 10 µg/ml de puromicina (Calbiochem #540411), y 0.078% de bicarbonato de sodio (Thermo Hyclone #SH30033.01).

Para el ensayo, las células CHO-Tie-2 pueden ser resuspendidas a 10,000 células por cavidad (en 100 µl de medio de crecimiento), en el interior de 60 cavidades de placas de 96 cavidades recubiertas con lisina (BD Biocoat #356640). 200 µl de D-PBS pueden ser colocados en las cavidades de borde para reducir la evaporación. Las células pueden ser incubadas durante la noche a 37°C, 95% de RH, 5% de CO₂. Al siguiente día, las células pueden ser lavadas una vez y el medio puede ser reemplazado con 100 µl de medio de crecimiento libre de suero que contiene 0.1% de BSA (Sigma #A7979, baja endotoxina). Las células pueden entonces ser sometidas a inanición por 7.5 hasta 24 horas en medio libre de suero a 37°C, 95% de RH, 5% de CO₂. Durante el periodo de inanición, los anticuerpos (a 6X las concentraciones finales) pueden ser serialmente diluidos 1:2 en placas de polipropileno en medio de crecimiento libre de suero que contiene 0.1% de BSA. El Ang2 humano (R&D Systems #623-AN, reconstituido en D-PBS/0.1% de BSA) y Ang1 humano (R&D Systems #923-AN, reconstituido en D-PBS/0.1% de BSA) también puede ser diluido a 6X la concentración final en medio de crecimiento libre de suero que contiene 0.1% de BSA. Los anticuerpos y el ligando Ang2 o Ang1 puede entonces ser mezclado a una relación 1:1 en placas de polipropileno y pueden ser incubados por 1 hora a 37°C. Las mezclas de anticuerpo/ligando entonces pueden ser agregadas a 50 µl por

cavidad a la células (en cavidades triplicadas por tratamiento) y pueden ser incubadas por 13 minutos a 21 horas a 37°C, 95% de RH, 5% de CO₂. El intervalo de concentración final del anticuerpo puede ser 0.0625 - 283 nM, y la
5 concentración final de Ang2 y Ang1 humano puede ser 0.3 µg/ml (aprox. 6 nM) y 0.5 µg/ml (aprox. 8.9 nM), respectivamente. Después del tiempo de incubación, el medio puede ser rápidamente y completamente removido de las células, y las células pueden ser sometidas a lisis en 60 µl por cavidad de
10 Amortiguador de Lisis Tris 1X frío (Meso Scale Discovery #R60TX; 150 mM de NaCl, 20 mM de Tris pH 7.5, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1% de Triton X-100) el cual puede contener proteasa recientemente agregada e inhibidores de fosfatasa (cóctel inhibidor de proteasa 1X, Sigma #P8340; cóctel 2
15 inhibidor de fosfatasa 1X, Sigma #P5726; cóctel 3 inhibidor de fosfatasa 1X, Sigma #P0044; 1 mM de ortovanadato de sodio activado final (EMD Chemicals #567540)). Las placas pueden entonces ser colocadas en hielo por 10 minutos, después de lo cual pueden ser colocadas en un sacudidor orbital a baja
20 velocidad por 25 minutos a 4°C. Las placas pueden entonces ser selladas y congeladas a -80°C.

El día antes del análisis para fosfo-Tie-2 (con un kit ELISA DuoSet de fosfo-Tie-2 humano de R&D Systems, #DYC2720), placas de ELISA de alta unión (Greiner BioOne, #655081) pueden ser recubiertas durante la noche a 4°C con 4
25

µg/ml de anticuerpo de captura Tie-2 total anti-humano de ratón en amortiguador de recubrimiento por ELISA 1X (Surmodics/BioFX Labs #COAT-1000-01).

El día de la medición de fosfo-Tie-2, las placas
5 que contienen los lisados pueden ser congeladas en hielo. Las placas de ELISA recubiertas pueden ser lavadas con amortiguador de lavado (1X de TBST que contiene 0.05% de Tween 20) y bloqueadas con 300 µl por cavidad de amortiguador de bloqueo (1% de BSA (Jackson ImmunoResearch #001-000-162;
10 IgG-free, libre de proteasa), 0.01% de azida de sodio) por un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente en un sacudidor orbital (mientras se cubre con selladores de placa). Durante el bloqueo, los lisados pueden ser diluidos 1:5 o 1:10 en placas de polipropileno en amortiguador de lisis frío que
15 contiene inhibidores de proteasa y fosfatasa. Las placas ELISA pueden ser bloqueadas y lavadas 4X, y 100 µl por cavidad de lisados diluidos (o estándares ELISA fosfo-Tie-2) pueden ser agregadas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, cubiertas con selladores, en un sacudidor orbital.
20 Las placas pueden ser lavadas 4X y se pueden agregar 100 µl por cavidad de anti-fosfo tirosina de ratón conjugada con HRP (diluida como se recomienda en el vial, en TBST/0.1% de BSA). Las placas pueden entonces ser convertidas en selladores, e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente en un sacudidor
25 orbital. Las placas pueden entonces ser lavadas 6X y se puede

asegurar la remoción del líquido de las cavidades. Las placas pueden entonces ser desarrolladas agregando 100 µl por cavidad de un sustrato de TMB de un componente (Surmodics/BioFX Labs #TMBW-1000-01). Las placas pueden ser
5 dejadas desarrollar por 20 o 30 minutos a temperatura ambiente cubiertas con papel aluminio. El desarrollo puede ser detenido con 100 µl por cavidad de solución de detención de ácido (solución de detención TMB, Surmodics/BioFX Labs #LSTP-1000-01). Las placas pueden entonces ser mezcladas en
10 un sacudidor orbital. Las placas ELISA pueden ser leídas a 450 nm en un lector ELISA (Molecular Devices SpectraMax 190), usando software SOFTmax PRO 5.4.1 (Molecular Devices Corp.). Los valores de fosfo-Tie-2 para las muestras se pueden obtener a partir de la curva estándar (ajuste logístico de 4
15 parámetros), y multiplicados por el factor de dilución de 5 o 10. El porcentaje de inhibición puede ser calculado por la siguiente fórmula:
$$\left(\frac{\text{valor de pTie2 del valor pTie2 de tratamiento medio del tratamiento solo de Ang2}}{\text{valor pTie2 solo medio mediano} - \text{valor pTie2 medio de tratamiento solo de Ang2}} \right) * 100.$$

20

Los valores IC_{50} para inhibición de fosfo-Tie-2 inducida por Ang2 pueden ser calculados con GraphPad Prism 4, usando valores X Log-transformados. Puede ser realizado análisis de regresión no lineal (ajuste de curva) (respuesta
25 de dosis sigmoidal, inclinación de variable) en los datos

log-transformados para obtener valores IC_{50} . Si se realiza un experimento más de una vez, el valor IC_{50} de la media geométrica (y 95% de intervalo de confianza) entre los experimentos puede ser calculado.

5 En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Anticuerpo A neutraliza dependientemente de la dosis fosfo-Tie-2 inducido por Ang2 humano en células CHO-Tie-2 con una IC_{50} de 0.773 nM (95% de intervalo de confianza 0.412 - 1.45 nM) (n=3). Además, el
10 Anticuerpo A no neutraliza el fosfo-Tie-2 inducido por Ang1 humano en células CHO-Tie-2 cuando se compara con el anticuerpo reactivo cruzado anti-Ang1/2 3.19.3-293HEK. El Anticuerpo A y H1H685P-293HEK tienen valores IC_{50} de neutralización Ang2 comparables.

15 **Represión de desarrollo de vasos sanguíneos inducida por Ang2**

La represión *in vivo* de la angiogénesis fisiológica por un anticuerpo Ang2 puede ser medida en un modelo de desarrollo de vasos sanguíneos en la retina de ratón. El
20 ensayo mencionado anteriormente puede ser usado para estudiar la capacidad de los anticuerpos de la presente invención para reprimir la angiogénesis fisiológica en la retina de ratón.

Para este ensayo, el día de suministro al cachorro de ratón por las hembras preñadas puede ser marcado P0 (día
25 post-natal 0). Después del suministro, en los días dos y

cuatro (P2 y P4), los cachorros pueden ser inyectados con el control de vehículo (PBS) o 10 mg/kg de Anticuerpo A. A P5 los ratones pueden ser sacrificados y los ojos pueden ser recolectados y pueden ser fijados en formalina por 5 horas y
5 pueden ser lavados con PBS.

Las retinas pueden entonces ser disectadas, y pueden ser teñidas con anti-CD31 diluido a 1:200 (BD Pharmingen; clon MEC 13.3; Catálogo 553370), y anti-SMA-FTIC diluido a 1:200 (Sigma; Clon 1A4 Catálogo F3777). Para las
10 retinas tratadas con anti-CD31, un Alexa-647 anti-rata diluido a 1:400 (Jackson Immuno Research; Catálogo 712-606-153) puede ser usado como un anticuerpo secundario. La adquisición de las retinas se puede hacer usando Nikon Ti, y cuantificaciones de la progresión vascular, número de células
15 de punto de brotación, y densidad vascular de plexos de remodelación pueden ser realizados usando software FIJI. Imágenes de alta amplificación pueden ser adquiridas usando un Nikon A1 confocal.

En experimentos realizados esencialmente como se
20 describe en este ensayo, el Anticuerpo A reprime el progreso vascular, reduce tanto el número de células de la punta endotelial como densidad vascular, así como también una cubierta del pericito incrementada similarmente a 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg cuando se compara con el grupo de control de
25 PBS. Estos datos son estadísticamente significantes con $p <$

0.0001 para todos los grupos de tratamiento cuando se compara con el grupo de control de PBS (Tabla 5).

Tabla 5

Parámetros	Vehículo (PBS)	Anticuerpo A (30mg/kg)	Anticuerpo A (10mg/kg)	Anticuerpo A (3mg/kg)
Progresión vascular				
Media (%)	100	59.91	59.76	67.73
Error estándar de la media	5.046	3.848	2.524	2.463
Valor P (vehículo contra compuestos) (prueba Dunnetts)		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Valor P (30 vs. 10 y 3mg/kg) (prueba Dunnetts)			> 0.9999	0.2457
Valor P (10 vs. 3mg/kg) (prueba Dunnetts)				0.2892
Número de células de punta				
Media (%)	100	41.82	47.79	52.25
Error estándar de la media	6.181	3.25	4.647	3.474
Valor P (vehículo contra compuestos) (prueba Dunnetts)		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Valor P (10 y 3mg/kg) (prueba Dunnetts)			0.6685	0.1899
Valor P (10 vs. 3mg/kg) (prueba Dunnetts)				0.8290
Densidad vascular				
Media (%)	100	58.51	55.97	60.06
Error estándar de la media	4.48	2.685	3.569	3.056
Valor P (vehículo contra compuestos) (prueba Dunnetts)		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Valor P (10 y 3mg/kg) (prueba Dunnetts)			0.9105	0.9735
Valor P (10 vs. 3mg/kg) (prueba Dunnetts)				0.7396

Efectos anti-angiogénicos *in vivo* de Anticuerpo A en modelo de injerto heterólogo en cáncer de próstata PC3

El efecto anti-angiogénico de anticuerpos Ang2 y anticuerpos Ang2 en combinación con anticuerpos VEGFR2 puede ser evaluado en un modelo de injerto heterólogo de cáncer de próstata PC3.

Ratones que portan tumores de injerto heterólogo PC3 a aproximadamente 250 mm³ de volumen, aleatorizados a 10 ratones/grupo, pueden ser tratados con IgG1 de control, DC101 (un anticuerpo murino anti-VEGFR2), anticuerpo A, DC101 + Anticuerpo A por 6 días (2QW; 20 mg/kg). Después de seis días, los tumores pueden ser recolectados, fijados y seccionados. Los tumores seccionados pueden ser teñidos por CD105 y el área total de los vasos puede ser determinada.

En experimentos realizados esencialmente como se describe, cuando se comparan con el grupo IgG1 de control, se reduce el área del vaso total por 65% en el grupo de tratamiento de DC101, 69% en el grupo de tratamiento A del anticuerpo, y 84% en el grupo de tratamiento de combinación. Cuando se compara con el grupo de control IgG1, estos resultados fueron estadísticamente significantes con un $p < 0.0001$ para todos los grupos de tratamiento.

Anticuerpo A y anti-VEGFR2 anticuerpo inhiben el crecimiento del tumor *in vivo*

La eficacia de los anticuerpos de la presente

invención puede ser medida mediante modelos de injerto heterólogo *in vivo*. La eficacia antitumoral de DC101 (un anticuerpo murino anti-VEGFR2), Anticuerpo A y su combinación, pueden ser evaluados en un modelo de cáncer de mama derivado subcutáneo de paciente triple negativo (EL1997) y el modelo de injerto heterólogo de ovario subcutáneo (SKOV3x.1). Los ratones que portan los tumores pueden ser tratados con anticuerpos diluidos en PBS, en una base dos veces por semana mediante inyección intra-peritoneal. El crecimiento del tumor puede ser determinado por tres mediciones de pinza dimensional de volúmenes de tumor dos veces por semana durante el curso de tratamiento.

Injertos heterólogos derivados de paciente con cáncer de mama triple negativo EL1997: Ratones inmunodeficientes que portan injertos heterólogos derivados de pacientes con cáncer de mama triple negativo EL1997 (TNBC PDX) a aproximadamente 350mm³ de volumen aleatorizados a n=7 ratones/grupo pueden ser tratados con el control de vehículo, monoterapia de DC101 a 20 mg/kg, monoterapia de Anticuerpo A a 20 mg/kg, combinación de Ciclofosfamida y Doxorubicina a 100 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente, combinación de DC101 y Anticuerpo A o combinación de Ciclofosfamida, Doxorubicina, DC101 y Anticuerpo A dosificados a las mismas concentraciones de la monoterapia respectiva. Los tratamientos pueden ser administrados dos veces a la semana por 4 semanas

consecutivas.

En experimentos realizados esencialmente como se describe, los grupos de tratamiento con monoterapia de DC101 y Anticuerpo A, presentaron un %T/C (cambio en el volumen del tumor) de 35.2% y 56.7%, respectivamente. La combinación de los dos anticuerpos, DC101 y Anticuerpo A resultó en un %T/C de 19.9%. Además, la combinación de Ciclofosfamida, Doxorubicina, DC101 y Anticuerpo A resultó en un %T/C de 0.4%, con una reducción estadísticamente significativa (p=0.0019) en el volumen del tumor cuando se compara con la combinación de DC101 y Anticuerpo A. El tratamiento de combinación de los agentes quimioterapéuticos solos, Ciclofosfamida y Doxorubicina resultó en un %TC de 32%. Estos resultados indican que el tratamiento de monoterapia con DC101 o Anticuerpo A es eficaz, y tiene potencial para mayor eficacia en combinación; lo cual es además mejorado con la adición de agentes quimioterapéuticos.

Injertos heterólogos de ovario SKOV3x.1: Ratones inmunodeficientes que portan injertos heterólogos de ovario SKOV3x.1 a aproximadamente 350mm³ de volumen, aleatorizados a n=10 ratones/grupo, pueden ser tratados con control de vehículo, monoterapia de Anticuerpo A a 3, 10 o 30 mg/kg, monoterapia de Paclitaxel a 25 mg/kg o la combinación de Paclitaxel y Anticuerpo A a 25 mg/kg y 10mg/kg respectivamente. Los tratamientos pueden ser administrados

dos veces a la semana por 4 semanas.

En experimentos realizados esencialmente como se describe, los resultados mostraron valores de %T/C de 39.1, 32.5 y 27.3 para dosis de 3, 10 y 30 mg/kg de Anticuerpo A respectivamente y %T/C de 20.3 para 25 mg/kg de monoterapia de paclitaxel con valores p de <0.001 comparado con el control. La combinación de 25 mg/kg de Paclitaxel y 10 mg/kg de Anticuerpo A, mejora la eficacia de las dos monoterapias, mostrando un %T/C de 7.1% cuando se compara con el grupo de control de vehículo.

Injertos heterólogos de vario SKOV3x.1: Ratones inmunodeficientes que portan injertos heterólogos de ovario SKOV3x.1 a aproximadamente 250mm³ de volumen, aleatorizados a n=10 ratones/grupo, pueden ser tratados con el control de vehículo, monoterapia de DC101 a 20 mg/kg, monoterapia de Paclitaxel a 25 mg/kg, combinación de DC101 y Anticuerpo A a 25 mg/kg cada uno, o combinación de Paclitaxel, DC101 y Anticuerpo A dosificados a las concentraciones respectivas de la monoterapia. Los tratamientos pueden ser administrados dos veces a la semana por 4 semanas.

En experimentos realizados esencialmente como se describe, el tratamiento de monoterapia de DC101 resultó en un %T/C de 9.6%, mientras la combinación de los dos anticuerpos, DC101 y Anticuerpo A, resultó en un %T/C mejorado de 0.1% cuando se compara con el grupo de control de

vehículo. La combinación de Paclitaxel, DC101 y Anticuerpo A resultó en regresiones de tumor de aproximadamente -33% comparado con un %T/C de 17.8% para la monoterapia con Paclitaxel. Estos resultados indican en el modelo de injerto

5 heterólogo que la inhibición de VEGFR2 con DC101 tiene potencial para mayor eficacia en combinación con el Anticuerpo A. El beneficio de esta combinación es además mejorado con la adición de un agente quimioterapéutico que conduce a regresiones estadísticamente significantes en

10 volúmenes del tumor.

15

20

25

Secuencias de Aminoácido y Nucleótido

SEQ ID NO: 1 (HCVR de Anticuerpo A)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNMVWVRQAPGGGLEWMGYI
 DPYNGGTGYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTDRYDVWYFDVWG
 5 QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 2 (HC de Anticuerpo A)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNMVWVRQAPGGGLEWMGYI
 DPYNGGTGYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTDRYDVWYFDVWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 10 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
 AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQ
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR
 WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG

15 SEQ ID NO: 3 (LCVR de Anticuerpo A)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQDVYIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWA
 STRDTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYSSYPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 4 (LC de Anticuerpo A)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQDVYIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWA
 20 STRDTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYSSYPPTFGGGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 5 (ADN de LC de Anticuerpo A)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
 25 AGAGTCACCATCACTTGTAAGGCCAGTCAGGATGTGTATATTGCTGTAGCCTGGTATCAGC

AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTGGGCATCCACCCGGGACACTGGGGT
 CCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG
 CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCACCAATATAGCAGCTATCCTCCTACGTTTCG
 GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
 5 GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
 AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGAC
 GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
 CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC
 10 SEQ ID NO: 6 (ADN de HC de Anticuerpo A)
 CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
 GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGACTACAACATGGTGTGGGTGC
 GACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATATATTGATCCTTACAATGGTGGTAC
 TGGCTACAACCAGAAGTTCGAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACA
 15 GCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAA
 CGAGGGATAGGTACGACGTCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
 CTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC
 TCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG
 TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTC
 20 CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAG
 ACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGT
 CCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGT
 CTTCTGTTCCCCCCTTCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACG
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATG
 25 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCG

TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC
 AGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCA
 GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAA
 5 AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
 CCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
 TCTCTGGGT

SEQ ID NO: 7 (Ang2 humano)

10 YNNFRKSMDSIGKKQYQVQHGSCSYTFLLPEMDNCRSSSSPYVSNVQORDA
 PLEYDDSVQRLQVLENIMENNTQWLMKLENYIQDNMKKEMVEIQQNAVQNQTAVMIEIGTN
 LLNQTAEQTRKLT DVEAQVLNQTTRELEQLLEHSLSTNKLEKQILDQTSEINKLQDKNSFL
 EKKVLAMEDKHIIQLQSIKEEKDQLQVLVSKQNSIIEELEKKIVTATVNNSVLQKQQHDLM
 ETVNNLLTMMSTSNSAKDPTVAKEEQISFRDCAEVFKSGHTTNGIYTLTFPNSTEEIKAYC
 15 DMEAGGGGWTIIQRREDGSVDFQRTWKEYKVGFGNPSGEYWLGNFVSQLTNQQRVYVLKIH
 LKDWEAGNEAYSLEYEHFYLSSSEELNYRIHLKGLTGTAGKISSISQPGNDFSTKDGDNDKCIC
 KCSQMLTGGWWFDACGPSNLNGMYYPQRQNTNKFNGIKWYYWKSGSYSLKATTMMIRPADF

SEQ ID NO: 8 (LCDR1 de Anticuerpo A)

KASQDVYIAVA

20 SEQ ID NO: 9 (LCDR2 de Anticuerpo A)

YWASTRDT

SEQ ID NO: 10 (LCDR3 de Anticuerpo A)

HQYSSYPPT

SEQ ID NO: 11 (HCDR1 de Anticuerpo A)

25 GYSFTDYNMV

SEQ ID NO: 12 (HCDR2 de Anticuerpo A)

YIDPYNGGTGYNQKFEG

SEQ ID NO: 13 (HCDR3 de Anticuerpo A)

ARTRDRYDVWYFDV

5

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

5 1. Un anticuerpo que se une a Ang2 humano (SEQ ID NO: 7), caracterizado porque comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en donde la cadena ligera comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que consisten de las secuencias de
10 aminoácido KASQDVYIAVA (SEQ ID NO: 8), YWASTRDT (SEQ ID NO: 9), y HQYSSYPPT (SEQ ID NO: 10), respectivamente, y en donde la cadena pesada comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que consisten de las secuencias de aminoácido GYSFTDYNMV (SEQ ID
15 NO: 11), YIDPYNGGTGYNQKFEG (SEQ ID NO: 12), y ARTRDRYDVWYFDV (SEQ ID NO: 13), respectivamente.

2. Un anticuerpo, caracterizado porque comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en donde la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera
20 (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en donde la LCVR tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 3, y la HCVR tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 1.

3. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de
25 las Reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la LC tiene

la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 4, y la HC tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 2.

4. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, caracterizado porque comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en donde cada cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 4, y cada cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido proporcionada en la SEQ ID NO: 2.

5. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, caracterizado porque una de las cadenas pesadas forma un enlace disulfuro inter-cadena con una de las cadenas ligeras, y la otra cadena pesada forma un enlace disulfuro inter-cadena con la otra cadena ligera, y una de las cadenas pesadas forma dos enlaces disulfuro inter-cadena con la otra cadena pesada.

6. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el anticuerpo es glicosilado.

7. Una célula de mamífero, caracterizada porque comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4 y una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2, en donde la

célula es capaz de expresar un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.

5 8. Un proceso para producir un anticuerpo, caracterizado porque comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2, que comprende cultivar la célula de mamífero de
10 conformidad con la Reivindicación 7 bajo condiciones de manera que el anticuerpo es expresado, y recuperar el anticuerpo expresado.

9. Un anticuerpo caracterizado porque se produce por el proceso de conformidad con la Reivindicación 8.

15 10. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 o 9, y un portador, diluyente o excipiente aceptable.

20 11. Un método para tratar cáncer, caracterizado porque comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 o 9.

25 12. El método de conformidad con la Reivindicación 11, caracterizado porque el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma

hepatocelular.

13. El método de conformidad con la Reivindicación 11 o 12, caracterizado porque comprende además, administrar simultáneamente, separadamente, o secuencialmente, una
5 cantidad efectiva de ramucirumab.

14. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 o 9, para uso en terapia.

15. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 o 9, para uso en el tratamiento de
10 cáncer.

16. El anticuerpo para uso de conformidad con la Reivindicación 15, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma hepatocelular.

15 17. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 o 9, en combinación simultánea, separada, o secuencial con ramucirumab, para uso en el tratamiento de cáncer.

18. La combinación para uso de conformidad con la
20 Reivindicación 17, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma hepatocelular.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a angiopoyetina-2 humana (Ang2, por sus siglas en inglés), y pueden ser útiles para tratar cáncer solo y en
5 combinación con inhibidores de la trayectoria de VEGF, especialmente cáncer accionado por VEGFR2 y Ang2, que incluyen cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, de ovario, colorrectal, y de mama.

10

15