ANTICUERPOS ANTI-ANGPT2

LISTADO DE SECUENCIAS

[0000] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. La copia ASCII, creada el 11 de junio de 2019, se denomina 090697-US-1_SL.txt, y su tamaño es de 78.465 bytes.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] En general, la presente invención se refiere a anticuerpos neutralizantes anti-angiopoyetina 2 (ANGPT2) para uso diagnóstico y terapéutico. Más específicamente, se divulgan anticuerpos anti-ANGPT2 y métodos de uso para el tratamiento de varias enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan ANGPT2. También se divulgan composiciones y kits farmacéuticos que comprenden los anticuerpos anti-ANGPT2.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La disfunción endotelial es una característica distintiva de la enfermedad renal crónica (CKD) y las complicaciones cardiovasculares asociadas. La investigación básica y clínica sugiere que mejorar la función vascular renal en CKD reducirá la proteinuria y ralentizará la disminución en la función renal sobre SOC. Además, se esperaría que una reducción en ANGPT2 genere un impacto positivo en las enfermedades cardiovasculares en pacientes con CKD que incluyen insuficiencia cardíaca, MI, apoplejía y otros (Eleuteri 2011, Lukasz 2013, Poss 2015, Lorbeer 2015, Tsai 2016, Gerstein 2015, Chen 2009, Chen 2010a, Chen 2010b, Gurnik 2016).

[0003] El eje ANGPT-Tie humano consiste en dos receptores de la tirosina quinasa tipo I (Tie1, Tie2) y dos ligandos segregados (ANGPT1, ANGPT2). ANGPT1 es un agonista del receptor de Tie2 que induce la fosforilación del receptor y activa vías de señalización corriente abajo necesarias para conservar la función vascular renal, mientras que ANGPT2 es un antagonista funcional de ANGPT1 que se fija a Tie2. El Tie2 fijado a ANGPT1 se transloca a uniones celulares interendoteliales, en donde ANGPT1 multimérico puede formar complejos endoteliales cruzados con receptores Tie2 de células adyacentes para estabilizar la estructura capilar glomerular. De manera intracelular, la fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT1 conduce al reclutamiento de proteínas adaptadoras que produce la activación de vías de promoción de supervivencia AKT y suprime la activación de la vía apoptótica.

[0004] Un pequeño estudio que investiga una función de ANGPT2 en la nefropatía

diabética (DN) describe un SNP (1233 A/G) asociado a una elevación de 20 % en ANGPT2 circulante y aumento subsiguiente en la gravedad de DN (Quan, 2012). Si bien no se ha evaluado ningún anticuerpo de bloqueo de ANGPT2 en pacientes con CKD, se descubrió que la expresión de mARN de ANGPT2 en indígenas Pima con CKD está asociada de manera positiva a la fibrosis intersticial y fibrosis intimal. Otros demostraron que la expresión de mARN de ANGPT2 glomerular es elevada en pacientes con nefropatía diabética (DN) en comparación con niveles de riñones no enfermos (Dessapt-Baradez, 2014). Sin embargo, la expresión de mARN de ANGPT1 glomerular (Dessapt-Baradez, 2014) y proteína circulante (Chang, 2013; Chang, 2014) se encuentran inalteradas en Dn, por lo que favorecen Tie2 fijado a ANGPT2 en el contexto de la progresión de la enfermedad.

[0005] Se obtuvieron observaciones clínicas clave que vinculan la desregulación de la vía ANGPT2-Tie2 con CKD a partir de estudios en donde los pacientes se estratificaron por etapa (de Etapa 1 a ESRD/HD) y en donde el ANGPT2 circulante se elevó de manera progresiva, en correlación con rigidez arterial (Chang, 2014) y en correlación inversa con una disminución en la tasa de filtración glomerular (GFR) medida por inulina (David, 2010). En una cohorte de pacientes con CKD 3-5, los niveles de ANGPT2 también se asociaron a la gravedad de albuminuria y marcadores de microinflamación sistémica (Chang, 2013). Al menos una parte de la ANGPT2 elevada en CKD se puede deber a una reducción en miR-145 que generalmente suprime la transcripción de ANGPT2 y, según se demostró, se reduce significativamente en pacientes con CKD en etapa 3-5 (Chen, 2013). Una presentación reciente en la Sociedad Estadounidense de Nefrología (Peters, 2018) demostró, en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa con albuminuria de referencia >30 mg/g, que la estimulación de la señalización de Tie2 usando la proteína tirosina fosfatasa endotelial vascular (VE), AKB-9778 (inyección s.c. una vez por día), era suficiente para reducir la relación albúmina a creatina en orina (UACR) aproximadamente 20 % en un estudio de fase 2A de 3 meses. Estos resultados respaldan que la estimulación de la señalización de Tie2 en pacientes altamente albuminúricos es suficiente para reducir la progresión de CKD. Los valores de importancia clínica para categorizar pacientes con CKD son: eGFR de 15 - 60 ml/min/1,73 m² y UACR de 30 mg/g o más.

[0006] De manera consistente con el concepto de que la desregulación del eje ANGPT2-Tie2 contribuye a CKD, los estudios preclínicos demuestran que la manipulación genética de cualquiera de los dos lados de la vía (ANGPT1 disminuido o

ANGPT2 aumentado) es suficiente para generar manifestaciones de la enfermedad. En ratones, la eliminación condicional de ANGPT1 genera nefropatía proteinúrica caracterizada por la función deficiente de la barrera de filtración glomerular, albuminuria y características patológicas observadas en seres humanos con nefropatía diabética avanzada (expansión de la matriz mesangial y glomeruloesclerosis; Jeansson, 2013). Además, la sobreexpresión de ANGPT2 específica de podocitos produjo mayor albuminuria, apoptosis endotelial glomerular y una reducción en las proteínas de la barrera de filtración (Davis, 2007). Otros demostraron que las expresiones renal y en plasma de ANGPT2 son elevadas después de nefrectomía 5/6 en ratones CD1 de manera concomitante con mayor tinción de ANGPT2 en los glomérulos (Chang, 2014). El mismo grupo demostró que el pepticuerpo de ANGPT2, L1-10, después de nefrectomía 5/6 bloqueó la expresión vascular y la regulación ascendente de múltiples marcadores profibróticos y proinflamatorios que incluyen TGFβ1, subtipos de colágeno y moléculas de adhesión, aunque no se indagaron los efectos en la fibrosis renal.

[0007] La ANGPT2 se expresa de manera predominante en tejidos que experimentan remodelación vascular y es elevada en la circulación en múltiples enfermedades, que incluyen CKD. Las células endoteliales (EC) producen y almacenan ANGPT2 en cuerpos de Weibel–Palade, gránulos de almacenamiento especializado de los cuales se puede liberar ANGPT2 rápidamente en la circulación para fijar los receptores Tie2 de EC de los vasos sanguíneos y linfáticas (Fiedler, 2004).

[0008] En el riñón humano normal, ANGPT2 y Tie2 se expresan en EC, incluso aquellas enfrentadas a la membrana basal glomerular, en las asas capitales, y EC en los glomérulos. Tie2 también se expresa en EC adyacentes al proceso de pies de los podocitos (Satchell, 2002).

[0009] El ligando agonista de Tie2, ANGPT1, se secreta de pericitos (Satchell, 2001) que rodean y soportan las células endoteliales subyacentes, y de manera importante, también de podocitos (Satchell, 2002), células renales especializadas que comprenden la barrera de filtración glomerular, por lo que permiten una diafonía entre podocitos y EC glomerulares adyacentes para estabilizar la estructura capilar glomerular.

[0010] ANGPT2 tiene expresión limitada en tejidos normales pero amplia expresión en la vasculatura activamente remodelada de tumores humanos. Bloquear la inhibición de ANGPT2 de la señalización de Tie2 es un objetivo atractivo para el tratamiento antiangiogénico contra el cáncer y enfermedades oculares con una base vascular. Se desarrollaron varios anticuerpos que bloquean la fijación de ANGPT2 a Tie2 para uso

clínico.

[0011] Específicamente, con base en estudios con anticuerpos ANGPT2 selectivos (REGN910) administrados por vía i.v., no se observaron problemas de seguridad que limiten la dosis en los ensayos clínicos de fase I (Papadopoulos, 2016). Un estimulador de Tie2 (AKB-9778) se evaluó en la fase II sin efectos adversos (AE) notables (Campochiaro, 2016), y en múltiples estudios clínicos a través de la fase III, se evaluó el bloqueador ANGPT1/2 dual (AMG386) que tuvo solamente AE leves y reversibles (Monk, 2014). Sin embargo, los enfoques terapéuticos menos selectivos con una relación menor de bloqueo ANGPT2:ANGPT1 (por ejemplo, AMG386,MEDI3617) se asociaron con una mayor observación de edema clínico que puede estar relacionado con un bloqueo dual de receptores Tie2 linfáticos dado que tanto ANGPT1 como ANGPT2 funcionan como agonistas del receptor Tie2 en la vasculatura linfática. Se considera que el bloqueo de Tie2 perturbó el flujo normal de la circulación linfática o venosa que produjo acumulación de líquido extracelular en general y edema linfático en particular (Monk, 2013). Se prevé que un anticuerpo de bloqueo de ANGPT2 altamente específico tendría un riesgo de edema significativamente menor; no se observó edema grado 3-4 en estudios de fase I con REGN910 (Papadopoulos, 2015).

[0012] El bloqueo de ANGPT2 puede tener impacto en la sensibilidad y función vascular y linfática.

[0013] Según se informó, la ANGPT2 tiene una función en la regeneración hepática (Hu, 2014); en la plasticidad reducida del lecho vascular; en la alteración de la recuperación del hígado y otros tejidos (Gale, 2002) que incluyen potencialmente los tejidos del pulmón, adiposos (An, 2017) y ovario (Coxon, 2010); y como activador regulador autocrino para respuestas inflamatorias de células endoteliales (Fiedler, 2006, Kim, 2016).

[0014] La función de ANGPT2 en el sistema linfático adulto no se conoce por completo. Sin embargo, Tie2 se expresa en múltiples tipos de leucocitos (monocitos, neutrófilos y eosinófilos) y la modulación de la señalización de Tie2 pueden alterar la sensibilidad inmunitaria (Grenga, 2015).

[0015] El bloqueo de ANGPT2 es un medio atractivo para prevenir otros trastornos respiratorios que incluyen hiperpermeabilidad vascular pulmonar, edema pulmonar (de pulmón), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), lesiones pulmonares agudas (ALI), neumonía intersticial idiopática, fibrosis pulmonar idiopática (IPF) e IPF con exacerbación aguda, síndrome respiratorio agudo grave (SARS) y síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS). El nivel alto en plasma de ANGPT2 tiene un

rol central en la filtración vascular anormal asociada al aumento en plasma del factor de Willebrand (marcador estándar de lesión endotelial) en septicemia y ARDS (Calfee, 2012). Los niveles en plasma de ANGPT2 y factor de Willebrand fueron considerablemente elevados en pacientes con septicemia y aún mayores en pacientes con ARDS (Van der Heijden, 2008). La ANGPT2 circulante fue considerablemente elevada en seres humanos con septicemia que también tenían oxigenación deficiente. El suero de estos pacientes interrumpió la arquitectura endotelial *in vitro*. Este efecto del suero con septicemia se revertió mediante ANGPT-1 (antagonista de ANGPT2) (Parikh, 2006). En un modelo de ratón de ARDS inducido por choque hemorrágico, el tratamiento previo de los ratones con un anticuerpo anti-angpt2 mejoró considerablemente la función pulmonar, la oxigenación de la sangre y la tasa de supervivencia (Lomas-Neira, 2016)

[0016] La mayor permeabilidad vascular (hiperpermeabilidad vascular) contribuye a muchas enfermedades, que incluyen ARDS, septicemia, septicemia grave, choque septicémico, cáncer e inflamación. La reducción de la hiperpermeabilidad vascular del pulmón reducirá la acumulación de líquido en el espacio alveolar (edema pulmonar) y, por lo tanto, mejorará el intercambio de gases entre el pulmón y los vasos, lo que producirá mejor oxigenación de la sangre arterial. La mejora de la oxigenación de la sangre arterial se traduce en una mejor oxigenación de todos los órganos (por ejemplo, cerebro, corazón, hígado, riñón) y reduce el riesgo de disfunción multiorgánica seguida de muerte.

[0017] El aumento de la permeabilidad vascular en septicemia, septicemia grave, choque septicémico, también se informa en varios órganos tales como pulmón, riñón, hígado y corazón. La acumulación de líquido en estos órganos afecta su adecuado funcionamiento (por ejemplo, provoca arritmia, alteración de la filtración glomerular o deficiencias del metabolismo) y produce disfunción multiorgánica seguida de muerte.

[0018] El edema pulmonar (de pulmón) es una afección en la que los pulmones se llenan de líquido. La causa más común de edema pulmonar es la insuficiencia cardíaca congestiva. Otras afecciones menos comunes que pueden causar edema pulmonar incluyen presión sanguínea alta repentina, neumonía, falla renal, daño pulmonar causado por infección grave, septicemia grave de la sangre o envenenamiento de la sangre causada por infección.

[0019] La lesión pulmonar aguda (ALI) es un trastorno pulmonar a menudo causado por inhalación de humo, que incluye, más recientemente, el uso de cigarrillos electrónicos o productos vaporizadores.

[0020] El síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) es una inflamación pulmonar caracterizada por un aumento de la permeabilidad vascular pulmonar y/o edema pulmonar. El ARDS a menudo se clasifica como leve, moderado o grave según el grado de hipoxemia. El ARDS puede surgir por varias causas, por ejemplo, puede estar inducido por una infección pulmonar bacteriana o viral, por septicemia, inhalación de sustancias dañinas, neumonía grave, traumatismo, pancreatitis (inflamación del páncreas), transfusiones masivas de sangre y quemaduras. La causa más común de ARDS es la septicemia.

[0021] El síndrome respiratorio agudo grave (SARS) es una enfermedad respiratoria viral causado por un coronavirus denominado coronavirus asociado a SARS (SARS-CoV). El SARS comienza con fiebre alta (temperatura mayor a 100,4 °F [>38,0 °C]). Otros síntomas pueden incluir dolor de garganta, tos, dolor de cabeza, sensación de malestar general y dolores corporales. Algunas personas también tienen síntomas respiratorios moderados en el inicio. La mayoría de los pacientes desarrollan neumonía. Desde 2004 hasta el brote pandémico de SARS-CoV-2 en diciembre de 2019, no se informaron casos conocidos de SARS en ninguna parte del mundo.

[0022] El síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) es una enfermedad causada por un virus (más específicamente, un tipo de coronavirus) denominado coronavirus de síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). Esta afección se caracteriza por enfermedad respiratoria grave, que incluye fiebre, tos y dificultad para respirar. Según se informó, alrededor de 3 o 4 de cada 10 pacientes con MERS murieron.

[0023] La septicemia, la septicemia grave y el choque septicémico son trastornos que surgen de la respuesta inflamatoria sistémica a una infección (ver Mitchell M. Levy et al., Crit Care Med. abril de 2003;31(4):1250-6). La septicemia es un trastorno que tiene una infección (por ejemplo, viral, bacteriana, traumatismo abdominal, perforación intestinal) y una respuesta inflamatoria sistémica. Esto produce un aumento de la permeabilidad vascular de varios órganos, tales como riñón, hígado, corazón y pulmón. La septicemia grave (septicemia con disfunción orgánica) se refiere a la septicemia con disfunción orgánica aguda causada por septicemia. El choque septicémico se refiere a hipotensión persistente que no se puede explicar por otras causas.

[0024] Por lo tanto, existe la necesidad de un anticuerpo neutralizante de alta afinidad a ANGPT2 que limitará la fijación antagonista de ANGPT2 a Tie2. Se prevé que la señalización de Tie2 tenga muchos efectos beneficiosos que incluyen, por ejemplo, estabilizar la estructura capilar glomerular, reducir la activación endotelial y restaurar la

integridad de la barrera de filtración. En total, se prevé que estos efectos beneficiosos disminuyan la proteinuria y preserven la función renal, lo que daría como resultado una progresión de la enfermedad ralentizada en pacientes con enfermedad renal crónica (CKD).

[0025] Se prevé también que los efectos beneficiosos de un anticuerpo neutralizante de alta afinidad a ANGPT2 ayuden en el tratamiento de pacientes afectados con hiperpermeabilidad vascular del pulmón y trastornos asociados.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

[0026] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se fijan específicamente a ANGPT2 humana. En un aspecto de la presente invención, los anticuerpos de la presente invención neutralizan ANGPT2. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos que se pueden aliviar al neutralizar ANGPT2.

[0027] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, en particular, un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado, que tiene una o más de las propiedades descritas en la presente más adelante.

[0028] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (H-CDR3), y

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3),

o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (H-CDR3); y

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3),

o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (H-CDR3); y

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3),

o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (H-CDR3); y

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (L-CDR3),

o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (H-CDR3); y

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3).

[0029] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8, respectivamente,

o

una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 9, respectivamente,

o

una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10, respectivamente, o

una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 11, respectivamente, o

una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 12, respectivamente,

[0030] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32,

o

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34,

o

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36,

o

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38,

o

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

[0031] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (H-CDR3), o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (H-CDR3), o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (H-CDR3); o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (H-CDR3); o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (H-CDR3);

y

una región de marco de la cadena pesada que comprende 1 a 4 secuencias de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 (H-FR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 (H-FR2); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 (H-FR3); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 (H-FR4).

[0032] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3), o

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3), o

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3), o

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (L-CDR3), o

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3);

y

una región de marco de la cadena liviana que comprende 1 a 4 secuencias de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 (L-FR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 (L-FR2); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 (L-FR3); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 (L-FR4).

[0033] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 117-148 de la región de dominio tipo fibrinógeno (FLD) del terminal carboxi de ANGPT2 humana con la SEQ ID NO: 50.

[0034] En otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo contra ANGTP2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a SEQ ID NO: 51.

[0035] En una forma de realización, el anticuerpo anti-ANGPT2 es un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado.

[0036] En otra forma de realización, el anticuerpo anti-ANGPT2 es un anticuerpo anti-ANGPT2 quimérico.

[0037] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo

anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para uso en la medicina.

[0038] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para usar en el tratamiento de enfermedades renales.

[0039] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para usar en el tratamiento de enfermedades hepáticas.

[0040] En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-ANGPT2, o fragmento de fijación al antígeno de este, y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0041] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se administran por una vía de administración parenteral, intravenosa, intravítrea o subcutánea.

[0042] En una forma de realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena liviana o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este.

[0043] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado o polinucleótidos que codifican una cadena liviana o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este.

[0044] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido aislado o polinucleótidos que codifican una cadena liviana o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este.

[0045] En una forma de realización, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido aislado o polinucleótidos que codifican una cadena liviana o región variable de la cadena liviana

de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este.

[0046] En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

obtener una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido aislado o polinucleótidos que codifican una cadena liviana o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este; y cultivar la célula huésped.

[0047] En una forma de realización, el método para producir un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, también comprende recuperar y purificar el anticuerpo anti-ANGPT2, o el fragmento de fijación al antígeno de este.

[0048] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden:

una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 31 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 3; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 32 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 8, o

un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 33 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 4; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 34 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 9,

o

un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 35 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 5; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 36 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 10,

o

un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 37 o una región variable

de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 6; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 38 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 11,

o

un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 39 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 7; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 40 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 12.

[0049] Los ejemplos no limitativos de enfermedades, trastornos o afecciones que se pueden aliviar mediante los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención incluyen hipertrofia cardíaca, infarto del miocardio, isquemia, lesión isquémica por revascularización, hipertensión por apoplejía, hipertensión arterial pulmonar, hipertensión arterial pulmonar idiopática, trastorno cerebral inducido por traumatismo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, esclerosis múltiple, hipertensión inducida por embarazo y preeclampsia, septicemia, septicemia grave, choque septicémico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis, enfermedad por cambios mínimos, glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS), síndrome nefrótico, enfermedad renal diabética (DKD), enfermedad renal crónica (CKD), insuficiencia renal diabética, enfermedad renal terminal, isquemia o lesión isquémica por revascularización, cáncer, carcinoma hepatocelular, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), enfisema, lesiones pulmonares agudas (ALI), síndrome de enfermedad respiratoria aguda (ARDS), síndrome respiratorio agudo grave (SARS), síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS), hiperpermeabilidad vascular (y trastornos asociados), lesión renal aguda (AKI), carcinoma de células renales, insuficiencia cardíaca, nefritis lúpica, fenómeno de Raynaud, pancreatitis, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardíaca congénita, virus del dengue, malaria, hantavirus, edema, regeneración, lupus, enfermedad pulmonar intersticial, escleroderma, retinopatías, nefropatía diabética, hipertensión portal, crecimiento de várices y trasplante de hígado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

[0050] Las Figuras 1A y 1B muestran los resultados (estudios duplicados) de un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) a base de células de angiopoyetina 2 que muestra la citotoxicidad de ANGPT2-opt-13 (-□-), un análogo de REGN910 (nesvacumab) (-△-), un análogo de MEDI3617 (-◇-) y LC06 (-✳-).

[0051] La Figura 2 muestra el mapeo de epítopos en el dominio FLD de cuerpos anti-ANGPT2 (SEQ ID NO: 59): CL-209881 inicial quimérico, ANGPT2-opt-13, un análogo de nesvacumab, un análogo de MEDI3617 y LC06. Los sitios de fijación específicos de cada molécula al dominio FLD extracelular de ANGPT2 humana (SEQ ID NO: 59) están resaltados en gris oscuro.

[0052] Las Figuras 3A-3F muestran resultados para un ensayo de bloqueo de ANGPT2 para ANGPT2-opt-1) (Figura 3A), ANGPT2-opt-2 (Figura 3B), ANGPT2-opt-13 (Figura 3C), ANGPT2-opt-19 (Figura 3D), ANGPT2-opt-31 (Figura 3E), CL-209881 inicial quimérico (Figura 3F) y un análogo de nesvacumab (Figura 3G).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0053] La estructura generalizada de anticuerpos o inmunoglobulina es conocida por las personas del oficio de nivel medio, estas moléculas son glucoproteínas heterotetraméricas, en general de alrededor de 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena liviana se liga de manera covalente a una cadena pesada mediante un puente disulfuro para formar un heterodímero, y la molécula heterotrimérica se forma mediante un enlace de disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de los heterodímeros. Si bien las cadenas livianas y pesadas se ligan mediante un puente disulfuro, la cantidad de enlaces de disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía según el isotipo de la inmunoglobulina. Cada cadena pesada y liviana también tiene puentes disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en el terminal amino un dominio variable (V_H = cadena pesada variable), seguido por 3 o 4 dominios constantes (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}), así como una región bisagra entre C_{H1} y C_{H2}. Cada cadena liviana tiene 2 dominios, un dominio variable del terminal amino (V_L = cadena liviana variable) y un dominio constante del terminal carboxi (C_L). El dominio V_L se asocia de manera no covalente con el dominio V_H, mientras que el dominio C_L, habitualmente, se liga de manera covalente al dominio C_{H1} mediante un puente disulfuro. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena liviana y la cadena pesada (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663.)

[0054] Ciertos dominios en los dominios variables difieren en gran medida entre los diferentes anticuerpos, es decir, son "hipervariables". Estos dominios hipervariables contienen residuos que están directamente involucrados en la fijación y especificidad de cada anticuerpo particular con su determinante antigénico específico. La hipervariabilidad, en los dominios variables de la cadena liviana y de la cadena

pesada, se concentra en tres segmentos conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o bucles hipervariables (HVL). Las CDR se definen mediante comparación de secuencias en Kabat et al., 1991, en: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., mientras que los HVL se definen estructuralmente de acuerdo con la estructura tridimensional del dominio variable, como lo describen Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917. Cuando estos dos métodos dan como resultado identificaciones levemente diferentes de una CDR, se prefiere la definición estructural. Como lo define Kabat, CDR-L1 se ubica aproximadamente en los residuos 24-34, CDR-L2 aproximadamente en los residuos 50-56 y CDR-L3 aproximadamente en los residuos 89-97 en el dominio variable de la cadena liviana; CDR-H1 se ubica aproximadamente en los residuos 31-35, CDR-H2 aproximadamente en los residuos 50-65 y CDR-H3 aproximadamente en los residuos 95-102 en el dominio variable de la cadena pesada. Por lo tanto, las CDR1, CDR2, CDR3 de las cadenas pesadas y livianas definen las propiedades únicas y funcionales específicas para un anticuerpo determinado.

[0055] Las tres CDR en cada una de las cadenas pesadas y livianas están separadas por las regiones marco (FR), que contienen secuencias que tienden a ser menos variables. Desde el terminal amino hasta el terminal carboxi de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana, las FR y CDR están dispuestas en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La configuración de lámina β de las FR acerca las CDR entre sí dentro de cada una de las cadenas y también las acerca a las CDR de la otra cadena. La conformación resultante contribuye con el sitio de fijación al antígeno (ver Kabat et al., 1991, NIH Publ. N.° 91-3242, vol. I, páginas 647-669), aunque no necesariamente todos los residuos de CDR participan de manera directa en la fijación al antígeno.

[0056] Los residuos de FR y los dominios constantes de Ig no participan directamente en la fijación al antígeno, pero contribuyen a la fijación al antígeno y/o median la función efectora del anticuerpo. Se cree que algunos residuos de FR tienen un efecto significativo en la fijación al antígeno en al menos tres maneras: mediante la fijación no covalente directamente a un epítopo, mediante la interacción con uno o más residuos de CDR, y mediante la afectación de la interfaz entre las cadenas pesadas y livianas. Los dominios constantes no participan directamente en la fijación al antígeno, pero median varias funciones efectoras de la Ig, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad

dependiente del complemento (CDC) y la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP).

[0057] Las cadenas livianas de las inmunoglobulinas de los vertebrados se asignan a una de dos clases que se diferencian claramente, kappa (κ) y lambda (λ), de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del dominio constante. En términos comparativos, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de los mamíferos se asignan a una de cinco clases principales, de acuerdo con la secuencia de los dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A su vez, IgG e IgA se dividen en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2, respectivamente. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Se conocen las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas nativas.

[0058] Las expresiones "anticuerpo", “anticuerpo anti-angiopoyetina 2”, "anticuerpo anti-ANGPT2", "anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado" y "variante del anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado" se usan en la presente en el sentido más amplio y abarcan específicamente anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos con modificaciones mínimas tales como truncamientos en el terminal N o C y fragmentos de anticuerpo, tales como dominios variables y otras porciones de anticuerpos que exhiben una actividad biológica deseada, por ejemplo, fijación a ANGPT2.

[0059] La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; es decir, los anticuerpos individuales en la población son idénticos, excepto por las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo sitio determinante antigénico, un “epítopo”. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica una población sustancialmente homogénea de anticuerpos que se dirigen al epítopo idéntico y no debe interpretarse en el sentido de que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Cabe destacar que los anticuerpos monoclonales se pueden fabricar mediante cualquier técnica o metodología conocidas en el estado de la técnica; que incluye, por ejemplo, el método de hibridoma (Kohler et al., 1975, Nature 256:495) o métodos de ADN recombinante conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, patente estadounidense N.° 4.816.567), o métodos de aislamiento de

anticuerpos monoclonales producidos de manera recombinante usando colecciones de anticuerpos de fago, mediante las técnicas descritas en Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628 y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

[0060] Los anticuerpos quiméricos consisten en las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo de una especie (por ejemplo, un mamífero no humano, tal como un ratón), en y las regiones constantes de las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, un ser humano), y se pueden obtener mediante la unión de las secuencias de ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo de la primera especie (por ejemplo, un ratón) con las secuencias de ADN de las regiones constantes del anticuerpo de la segunda especie (por ejemplo, un ser humano), y la transformación de un huésped con un vector de expresión que contiene las secuencias unidas para que pueda producir un anticuerpo quimérico. De manera alternativa, el anticuerpo quimérico también podría ser aquel en donde una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o cadena liviana son idénticas, homólogas o una variante de la secuencia correspondiente en un anticuerpo monoclonal de otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o de una secuencia de consenso o línea germinal. Los anticuerpos quiméricos pueden incluir fragmentos de esos anticuerpos, siempre que el fragmento de anticuerpo exhiba la actividad biológica deseada de su anticuerpo de origen, por ejemplo, la fijación al mismo epítopo (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.° 4.816.567; y Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

[0061] Las expresiones "fragmento de anticuerpo", “fragmento de fijación al antígeno”, "fragmento de anticuerpo anti-ANGPT2", "fragmento de anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado", "variante del fragmento de anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado" se refieren a una porción de un anticuerpo anti-ANGPT2 de longitud completa, en donde se retiene una región variable o una capacidad funcional, por ejemplo, la fijación a un epítopo de ANGPT2 específica. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, un fragmento Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, un anticuerpo monocatenario, un minicuerpo, un diacuerpo formado de fragmentos de anticuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

[0062] Los anticuerpos de longitud completa se pueden tratar con enzimas, tales como papaína o pepsina, para generar fragmentos de anticuerpos útiles. La digestión de papaína se usa para producir dos fragmentos de anticuerpos de fijación al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de fijación al

antígeno y un fragmento "Fc" residual. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el dominio C_{H1} de la cadena pesada. El tratamiento de pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de fijación al antígeno e incluso es capaz de generar reticulación con el antígeno.

[0063] Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la presencia de residuos adicionales que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo en el terminal C del dominio C_{H1}. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ son pares de fragmentos Fab' ligados mediante residuos de cisteína en la región bisagra. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0064] El fragmento "Fv" contiene un sitio de reconocimiento y fijación al antígeno completo que consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y la cadena liviana con una fuerte asociación no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de fijación al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de fijación al antígeno.

[0065] Un fragmento de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" es una variante de Fv monocatenario que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde los dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. El Fv monocatenario es capaz de reconocer el antígeno y fijarse a este. Opcionalmente, el polipéptido scFv también puede contener un ligador polipeptídico ubicado entre los dominios V_H y V_L, a fin de facilitar la formación de una estructura tridimensional deseada para la fijación al antígeno mediante el scFv (ver, por ejemplo, Pluckthun, 1994, en The Pharmacology of monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315).

[0066] Otros fragmentos de anticuerpos reconocidos incluyen aquellos que comprenden un par de fragmentos Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) para formar un par de regiones de fijación al antígeno. Estos “anticuerpos lineales” pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, como se describe, por ejemplo, en Zapata et al. 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062.

[0067] Un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado es un tipo específico de anticuerpo quimérico que incluye una variante de la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, o un fragmento de esta, que es capaz de fijarse a un antígeno predeterminado y que comprende una o más FR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o más CDR que

tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Esta secuencia de aminoácidos no humana, a menudo denominada secuencia "importada", generalmente se toma de un dominio de anticuerpo "importado", en particular, un dominio variable. En general, un anticuerpo humanizado incluye al menos las CDR o los HVL de un anticuerpo no humano, insertado entre las FR de un dominio variable de la cadena pesada o liviana humano.

[0068] La presente invención describe anticuerpos anti-ANGPT2 humanizados específicos que contienen CDR derivadas del CL-209881 inicial quimérico insertado entre las FR de dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana de la secuencia de línea germinal humana.

[0069] En un aspecto, un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado comprende sustancialmente todos o al menos uno, y en general dos, dominios variables (tales como, contenidos, por ejemplo, en los fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, Fabc y Fv), en donde todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y específicamente en la presente, las CDR son secuencias murinas de CL-209881 inicial quimérico y las FR son las de una secuencia de línea germinal o de consenso de inmunoglobulina humana. En otro aspecto, un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado también incluye al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, en general, de una inmunoglobulina humana. Con frecuencia, el anticuerpo contiene la cadena liviana y al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir una o más de las regiones C_{H1}, bisagra, C_{H2}, C_{H3} y/o C_{H4} de la cadena pesada, según corresponda.

[0070] Un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye gG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2 Por ejemplo, el dominio constante puede ser un dominio constante de fijación al complemento, en donde se desea que el anticuerpo humanizado exhiba actividad citotóxica, y el isotipo es generalmente IgG_1. Cuando no se desea esa actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de otro isotipo, por ejemplo, IgG_2. Un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado alternativo puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo de inmunoglobulina, y la selección de dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas se encuentra dentro del alcance de una persona del oficio de nivel medio.

[0071] No es necesario que las FR, las CDR o los HVL de un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado correspondan exactamente con las secuencias parentales. Por ejemplo, uno o más residuos en la secuencia HVL o CDR importada, en la secuencia de

consenso o en la secuencia FR de línea germinal se pueden alterar (por ejemplo, mutagenizar) mediante sustitución, inserción o eliminación, de modo que el residuo de aminoácido resultante ya no sea idéntico al residuo original en la posición correspondiente en ninguna de las secuencias parentales, pero que sin embargo el anticuerpo retenga la función de fijación a ANGPT2. En general, esta alteración no es extensiva y tiene alteraciones conservadoras. En general, al menos el 75 % de los residuos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de las secuencias de consenso parentales o las secuencias FR de línea germinal y CDR importadas, con mayor frecuencia, al menos el 90 % y, con máxima frecuencia, más del 95 %, más del 98 % o más del 99 %.

[0072] Los residuos de inmunoglobulina que afectan la interfaz entre las regiones variables de la cadena pesada y liviana ("la interfaz V_L-V_H") son aquellos que afectan la proximidad u orientación de las dos cadenas entre sí. Determinados residuos que pueden estar involucrados en las interacciones intercatenarias incluyen los residuos V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96, y 98, y los residuos V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 y 103 (utilizando el sistema de numeración descrito en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). patentes estadounidenses N.° 6.407.213 además explica que los residuos, tales como los residuos V_L 43 y 85, y los residuos V_H 43 y 60, también pueden participar en esta interacción. Si bien estos residuos se indican solo para la IgG humana, también se pueden aplicar a otras especies. Los residuos de anticuerpos importantes que se prevé razonablemente que estén involucrados en las interacciones intercatenarias se seleccionan para la sustitución en la secuencia de consenso.

[0073] Las expresiones "secuencia de consenso" y "anticuerpo de consenso" se refieren a una secuencia de aminoácidos que comprende el residuo de aminoácido más frecuente en cada lugar en todas las inmunoglobulinas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad particulares, por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina humana. La secuencia de consenso se puede basar en inmunoglobulinas de una especie particular o de varias especies. Una secuencia, estructura o anticuerpo de "consenso" abarca una secuencia de consenso humana, como se describe en ciertas formas de realización, y se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos más frecuentes en cada lugar, en todas las inmunoglobulinas humanas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad particulares. Por ello, la secuencia de consenso contiene una secuencia de aminoácidos que tiene, en cada posición, un aminoácido que está presente en una

o más inmunoglobulinas conocidas, pero que puede no duplicar exactamente la secuencia de aminoácidos completa de una inmunoglobulina simple. La secuencia de consenso de la región variable no se obtiene de ningún anticuerpo o inmunoglobulina producida de manera natural. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., y sus variantes. Las FR de las secuencias de consenso de las cadenas pesada y liviana, y sus variantes, proporcionan secuencias útiles para la preparación de anticuerpos anti-ANGPT2 humanizados. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.os 6.037.454 y 6.054.297.

[0074] Las secuencias de línea germinal humanas se encuentran naturalmente en la población humana. La combinación de esos genes de línea germinal genera diversidad de anticuerpos. Las secuencias de anticuerpos de la línea germinal para la cadena liviana del anticuerpo derivan de genes v y j kappa o lambda de la línea germinal humanos conservados. De modo similar, las secuencias de la cadena pesada derivan de genes v, d y j de la línea germinal (LeFranc, M-P y LeFranc, G, “The inmunoglobulin Facts Book” Academic Press, 2001).

[0075] Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes del entorno natural del anticuerpo son aquellos materiales que pueden interferir en los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden ser enzimas, hormonas u otros solutos proteicos o no proteicos. En un aspecto, el anticuerpo se purifica hasta obtener al menos más del 95 % de aislamiento en peso del anticuerpo.

[0076] Un anticuerpo aislado incluye un anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes en las que se produce, debido a que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, en general, un anticuerpo aislado se puede preparar mediante al menos una etapa de purificación en la que se retira el material celular recombinante.

[0077] La expresión "rendimiento del anticuerpo" se refiere a factores/propiedades que contribuyen al reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo o a la eficacia de un anticuerpo *in vivo*. Los cambios en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden afectar las propiedades del anticuerpo, como el plegamiento, y pueden influir en los factores físicos, como la velocidad inicial de la fijación del anticuerpo al antígeno (k_a), la constante de disociación del anticuerpo del antígeno (k_d), la constante de afinidad del anticuerpo con el antígeno (Kd), la conformación del anticuerpo, la estabilidad de las proteínas y la semivida del anticuerpo.

[0078] La expresión “anticuerpo neutralizante” o “anticuerpo de bloqueo” se refiere a un anticuerpo cuya fijación a ANGPT2 bloquea la interacción entre ANGPT2 y su receptor (Tie-2) y/o produce la inhibición de al menos una función biológica de ANGPT2. Cabe destacar que la inhibición causada por un anticuerpo de neutralizante o de bloqueo de ANGPT2 no necesita estar completa siempre que se pueda detectar mediante un ensayo apropiado. Los ensayos de ejemplo para detectar la inhibición de ANGPT2 se describen en la presente o son conocidos en el estado de la técnica.

[0079] Como se usan en la presente, la expresiones "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para lograr una máxima correspondencia. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean para lograr una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para lograr una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Luego se comparan los nucleótidos o residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo nucleótido o residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad= cant. de posiciones idénticas/cant. total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas)x100). En algunas formas de realización, las dos secuencias que se comparan tienen la misma longitud después de que se introducen los espacios dentro de las secuencias, según corresponda (por ejemplo, excluyendo la secuencia adicional que se extiende más allá de las secuencias que se comparan). Por ejemplo, cuando se comparan secuencias de la región variable, no se consideran las secuencias de dominio constante y/o inicial. Para las comparaciones de secuencias entre dos secuencias, una CDR "correspondiente" se refiere una CDR que tiene la misma ubicación en ambas secuencias (por ejemplo, CDR-H1 de cada secuencia).

[0080] El porcentaje de identidad o el porcentaje de similitud entre dos secuencias se pueden determinar mediante el uso de un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático que se usa para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, calificación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, calificación=50, longitud de palabra=3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína de interés. A fin de obtener alineaciones espaciadas para fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. De manera alternativa, se puede usar PSI-Blast para una búsqueda reiterada que detecta las relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático que se usa para comparar secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Este algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de *software* de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar las secuencias de aminoácidos, se pueden usar una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalidad por longitud de espacio de 12 y una penalidad por espacio de 4. En el estado de la técnica, se conocen algoritmos adicionales para el análisis de secuencia e incluyen ADVANCE y ADAM, como se describe en Torellis y Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; y FASTA como se describe en Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. En FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, las regiones similares en las dos secuencias que se comparan se encuentran al observar los pares de residuos alineados; si ktup=1, se examinan los aminoácidos alineados únicos. ktup se puede establecer en 2 o 1 para las secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para las secuencias de ADN. Si no se especifica ktup, el valor predeterminado es 2 para proteínas y 6 para ADN. De manera alternativa, la alineación de secuencias de proteínas se puede llevar a cabo usando el algoritmo CLUSTAL W, como se describe en Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

[0081] Una secuencia de ácidos nucleicos está "ligada operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un secretor inicial o presecuencia de ácidos nucleicos está ligado operativamente a un

ácido nucleico que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de fijación al ribosoma está ligado operativamente a una secuencia codificante si está ubicado para facilitar la traducción. En general, "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN ligadas son contiguas y, en caso de un secretor inicial, son contiguas y se encuentran en el marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores son opcionalmente contiguos. La fijación se puede obtener mediante la ligadura en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se pueden usar ligadores o adaptadores de oligonucleótidos sintéticos.

[0082] Como se usan en la presente, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las denominaciones incluyen la progenie de aquellos. Por ello, las expresiones "transformantes" y "células transformantes" incluyen los cultivos y las células sujeto primarias derivados de aquellos sin perjuicio de la cantidad de transferencias.

[0083] El término "mamífero", a los fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas y similares. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

[0084] Como se usa en la presente, un "trastorno" es cualquier afección que recibiría un beneficio del tratamiento con un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado descrito en la presente. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos o agudos que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

[0085] Como se usa en la presente, las expresiones "trastorno asociado a ANGPT2" o "enfermedad asociada a ANGPT2" se refieren a una afección en donde se indica la modificación o activación de células que expresan ANGPT2. Un trastorno asociado a ANGPT2 incluye enfermedades o trastornos tales como degeneración macular relacionada con la edad, atrofia geográfica, retinopatía diabética, edema macular diabético, retinitis pigmentosa, distrofia retiniana hereditaria, distrofia macular hereditaria, degeneración miópica, oclusiones venosas de la retina, oclusiones arteriales de la retina, endoftalmitis, uveítis, edema macular cistoide, membrana neovascular coroidea secundaria a cualquier enfermedad retiniana, neuropatías ópticas, glaucoma, desprendimiento de retina, retinopatía tóxica, retinopatía por radiaciones y retinopatía traumática, al igual que enfermedades de Alzheimer prodrómicas y leves a moderadas, atraso de la progresión de la enfermedad en

pacientes con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, trastorno depresivo mayor, esquizofrenia, deficiencia cognitiva asociada a la esquizofrenia, prevención de primer episodio psicótico en individuos con síndrome de psicosis atenuada, prevención de recaída en pacientes con esquizofrenia, depresión resistente al tratamiento, y enfermedades metabólicas, tales como hiperfagia, obesidad o síndrome metabólico.

[0086] Un trastorno asociado a ANGPT2 también incluye hipertrofia cardíaca, infarto del miocardio, isquemia, lesión isquémica por revascularización, hipertensión por apoplejía, hipertensión arterial pulmonar, hipertensión arterial pulmonar idiopática, trastorno cerebral inducido por traumatismo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, esclerosis múltiple, hipertensión inducida por embarazo y preeclampsia, septicemia, septicemia grave, choque septicémico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis, enfermedad por cambios mínimos, glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS), síndrome nefrótico, enfermedad renal diabética (DKD), enfermedad renal crónica (CKD), insuficiencia renal diabética, enfermedad renal terminal, isquemia o lesión isquémica por revascularización, cáncer, carcinoma hepatocelular, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), enfisema, lesiones pulmonares agudas (ALI), síndrome de enfermedad respiratoria aguda (ARDS), síndrome respiratorio agudo grave (SARS), síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS), hiperpermeabilidad vascular (y trastornos asociados), lesión renal aguda, carcinoma de células renales, insuficiencia cardíaca, nefritis lúpica, fenómeno de Raynaud, pancreatitis, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardíaca congénita, virus del dengue, malaria, hantavirus, edema, regeneración, lupus, enfermedad pulmonar intersticial, escleroderma, retinopatías, nefropatía diabética, hipertensión portal, crecimiento de várices y trasplante de hígado.

[0087] La expresión “inyección intravítrea” tiene su significado normal en el estado de la técnica y se refiere a la introducción de un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, en el cuerpo vítreo de un paciente.

[0088] La expresión "se fija específicamente" o similares significan que un anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de este forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Los métodos para determinar si dos moléculas se fijan específicamente se describen en la presente o son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones superficiales, y similares. En una forma de realización, la

fijación específica se caracteriza por un K_D de alrededor de 1 x 10^{-8} M o menos de acuerdo con el método de fijación de afinidad descrito en la sección de Ejemplos en la presente. En otra forma de realización, la fijación específica se caracteriza por un K_D de alrededor de 1 x 10^{-9} M o menos de acuerdo con el método de fijación de afinidad descrito en la sección de Ejemplos en la presente. Sin embargo, un anticuerpo aislado que se fija específicamente a Ang-2 humana puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tal como las moléculas de ANGPT2-2 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros productos químicos y/o materiales celulares.

[0089] La expresión "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, debajo de la piel de un animal o paciente humano, preferentemente, dentro de un reservorio entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración prolongada y relativamente lenta de un receptáculo de fármaco. El reservorio se puede crear apretando o separando la piel del tejido subyacente.

[0090] La expresión "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco debajo de la piel de un animal o paciente humano, preferentemente en un reservorio entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración prolongada y relativamente lenta de un receptáculo de fármaco durante un período de, por ejemplo, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. De manera opcional, la infusión se puede realizar mediante la implantación subcutánea de una bomba de administración de un fármaco implantada debajo de la piel de un animal o paciente humano, en donde la bomba administra una cantidad predeterminada del fármaco durante un período predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período que abarca la longitud del régimen de tratamiento.

[0091] La expresión "bolo subcutáneo" se refiere a la administración de un fármaco debajo de la piel de un animal o paciente humano, en donde la administración del fármaco en bolo tiene una duración menor de aproximadamente 15 minutos; en otro aspecto, menor de 5 minutos, y aun en otro aspecto, menor de 60 segundos. Aun en otro aspecto, la administración se realiza dentro de un reservorio entre la piel y el tejido subyacente, en donde el reservorio se puede crear apretando o separando la piel del tejido subyacente.

[0092] La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que alivia o mejora uno o más síntomas del trastorno que se trata. Al lograr esto, dicha cantidad

genera una evolución beneficiosa del paciente. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz tiene un efecto neuroprotector o neurorregenerativo. En otro aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la concentración sérica diana que demostró ser eficaz para, por ejemplo, ralentizar la progresión de la enfermedad. La eficacia se puede medir en formas convencionales, en función de la afección que se tratará. Por ejemplo, la eficacia se puede medir determinando las tasas de respuesta, por ejemplo, la recuperación de la vista, o evaluando el tiempo de atraso hasta la progresión de la enfermedad.

[0093] Los términos "tratamiento", "terapia" y similares, como se usan en la presente, incluyen medidas terapéuticas, profilácticas o supresoras que producen cualquier efecto deseable o beneficioso, incluidos, entre otros, el alivio o la mejora de uno o más síntomas, la regresión, la ralentización o el cese de la progresión de la enfermedad o el trastorno. Por ello, por ejemplo, el término "tratamiento" incluye la administración de un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, antes o después de la aparición de un síntoma de una enfermedad o trastorno, lo que implica la prevención o eliminación de uno o más signos de la enfermedad o el trastorno. Como otro ejemplo, el término incluye la administración de un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad. Asimismo, como se usan en la presente, el "tratamiento" o la "terapia" comprenden la administración de un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, después de la aparición y después del desarrollo de síntomas clínicos, en donde la administración afecta los parámetros clínicos de la enfermedad o del trastorno, tal como el grado de lesión tisular, o la amplitud o el grado de metástasis, ya sea que el tratamiento produzca o no la mejora de la enfermedad. Además, en la medida en que las composiciones de la invención, ya sea solas o en combinación con otro agente terapéutico, alivien o mejoren al menos un síntoma de un trastorno que se trata, en comparación con ese síntoma en ausencia del uso de la composición del anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, el resultado se debe considerar como un tratamiento eficaz del trastorno subyacente independientemente de si se produce un alivio de todos los síntomas del trastorno, o no.

[0094] El término "prospecto" se refiere a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la administración, las contraindicaciones y/o

las advertencias de uso de dichos productos terapéuticos.

[0095] Anticuerpos

[0096] En la presente se describen y se divulgan anticuerpos anti-ANGPT2, en particular, anticuerpos anti-ANGPT2 humanizados, al igual que composiciones y artículos de fabricación que comprenden anticuerpos anti-ANGPT2 de la presente invención. También se describen fragmentos de fijación al antígeno de un anticuerpo anti-ANGPT2. Los anticuerpos anti-ANGPT2, y los fragmentos de fijación al antígeno de estos, se pueden usar en el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos caracterizados por una reducción en la vía de ANGPT2. Un anticuerpo anti-ANGPT2 y un fragmento de fijación al antígeno de este incluyen al menos una porción que reconoce específicamente un epítopo de ANGPT2.

[0097] En una caracterización inicial, CL-209881 anti-ANGPT2 quimérico inicial se seleccionó en función de su rendimiento superior como anticuerpo. Se generó una colección de variantes mediante colocación de las CDR del anticuerpo quimérico inicial en las FR de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana de consenso humano y, además, mediante modificación por ingeniería genética de las FR con diferentes alteraciones.

[0098] Esto produjo 33 secuencias que se sometieron a optimización adicional y fijación de sensibilidad para proporcionar 6 candidatos finales con las propiedades mejoradas como se divulga en la presente. Las secuencias del anticuerpo de la invención se muestran a continuación:

[0099] SECUENCIAS VH

[00100] CL-209881_VH (inicial quimérico), cadena pesada variable, SEQ ID NO: 1

QVQLKQSGAELVKPGSSVKISCRAS<u>GYIFIDYFIN</u>WVKQRPGQGLEWIG<u>KIGPGSGSS</u>
<u>SSNEKFKG</u>KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR<u>EAFDYDGDYYGMAY</u>WG
QGTSVTVSS

[00101] cadena pesada variable de ANGPT2-opt-1 (humanizada), SEQ ID NO: 3

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS<u>GYIFIDYFIN</u>WVRQAPGQGLEWMG<u>KIGPGSGS</u>
<u>SSSNEKFKG</u>RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR<u>EAFDYEGDYYGMAY</u>WG
QGTLVTVSS

[00102] cadena pesada variable de ANGPT2-opt-2 (humanizada), SEQ ID NO: 4

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS<u>GYIFIEYFIN</u>WVRQAPGQGLEWMG<u>KIGPGSGS</u>
<u>SSSNEKFKG</u>RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR<u>EAFDYEGDYYGMAY</u>WG
QGTLVTVSS

[00103] cadena pesada variable de ANGPT2-opt-13 (humanizada), SEQ ID NO: 5

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQAPGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAFDYDGDYYGMAYWGQGTLVTVSS

[00104] cadena pesada variable de ANGPT2-opt-19 (humanizada), SEQ ID NO: 6
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQAPGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAFDYDGDYYGMAYWGQGTLVTVSS

[00105] cadena pesada variable de ANGPT2-opt-31 (humanizada), SEQ ID NO: 7
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQAPGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAFDYDGDYYGMAYWGQGTLVTVSS

[00106] SECUENCIAS VL

[00107] CL-209881_VL (inicial quimérico), cadena liviana variable, SEQ ID NO: 2
DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSVQAEDLAVYYCQNDHSYPITFGSGTKLEIK

[00108] cadena liviana variable de ANGPT2-opt-1 (humanizada), SEQ ID NO: 8
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLASGNQKNFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRESGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEIK

[00109] cadena liviana variable de ANGPT2-opt-2 (humanizada), SEQ ID NO: 9
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLASGNQKNFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRESGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEIK

[00110] cadena liviana variable de ANGPT2-opt-13 (humanizada), SEQ ID NO: 10
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLSSGNQKSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRETGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEIK

[00111] cadena liviana variable de ANGPT2-opt-19 (humanizada), SEQ ID NO: 11
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVLSSGNQKSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRETGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDHSYPITFGQGTKLEIK

[00112] cadena liviana variable de ANGPT2-opt-31 (humanizada), SEQ ID NO: 12
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLSSGNQKSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRESGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEIK

[00113] Las porciones subrayadas de las secuencias descritas anteriormente corresponden a las regiones CDR de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana.

[00114] Los anticuerpos anti-ANGPT2 humanizados de la presente invención son aquellos que tienen las secuencias de las cadenas pesada y liviana establecidas en la

siguiente tabla.

[00115] Tabla 1: LC DE LONGITUD COMPLETA Y SECUENCIAS DE HC DE LOS ANTICUERPOS ANTI-ANGPT2 HUMANIZADOS.

Anticuerpo	Secuencia	SEQ ID NO:
cadena pesada de ANGPT2-opt-1 (humanizada)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVR QAPGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAFDYEGDYYGMAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	31
cadena pesada de ANGPT2-opt-2 (humanizada)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIEYFINWVR QAPGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAFDYEGDYYGMAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	33
cadena pesada de ANGPT2-opt-13 (humanizada)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVR QAPGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAFDYDGDYYGMAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG	35

	CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	
cadena pesada de ANGPT2-opt-19 (humanizada)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVR QAPGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAFDYDGDYYGMAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	37
cadena pesada de ANGPT2-opt-31 (humanizada)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVR QAPGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAFDYDGDYYGMAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	39

cadena liviana de ANGPT2-opt-1 (humanizada)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLASGNQKNF LAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRESGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	32
cadena liviana de ANGPT2-opt-2 (humanizada)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLASGNQKNF LAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRESGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	34
cadena liviana de ANGPT2-opt-13 (humanizada)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLSSGNQKSF LAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRETGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
cadena liviana de ANGPT2-opt-19 (humanizada)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVLSSGNQKSF LAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRETGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDHSYPITFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	38
cadena liviana de ANGPT2-opt-31 (humanizada)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLSSGNQKSF LAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRESGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	40

[00116] Tabla 2: CDR DE LOS ANTICUERPOS ANTI-ANGPT2 HUMANIZADOS DE ACUERDO CON LOS SISTEMAS DE NUMERACIÓN DE CHEMICAL COMPUTING GROUP (CCG), KLABATHA Y CHOTHIA.

Anticuerpo	Secuencia	SEQ ID NO:

H-CDR1 de CL-209881 ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-19 ANGPT2-opt-31	GYIFIDYFIN	13
H-CDR1 de ANGPT2-opt-2	GYIFIEYFIN	14
H-CDR2 de CL-209881 ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2 ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-19 ANGPT2-opt-31	KIGPGSGSSSSNEKFKG	15
H-CDR3 de CL-209881 ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-19 ANGPT2-opt-31	EAFDYDGDYYGMAY	16
H-CDR3 de ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2	EAFDYEGDYYGMAY	17
L-CDR1 de CL-209881	KSSQSLLNSGNQKNFLA	18
L-CDR1 de ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2	KSSQSLLASGNQKNFLA	19
L-CDR1 de ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-31	KSSQSLLSSGNQKSFLA	20
L-CDR1 de ANGPT2-opt-19	RASQSVLSSGNQKSFLA	21

L-CDR2 de CL-209881 ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2 ANGPT2-opt-31	GASTRES	22
L-CDR2 de ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-19	GASTRET	23
L-CDR3 de CL-209881 ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2 ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-31	QNDHSYPIT	24
L-CDR3 de BI00767086	QQDHSYPIT	25
H-CDR1 de SEQ ID NO: 15 (Kabat)	**DYFIN**	26
H-CDR1 de SEQ ID NO: 16 (Kabat)	**EYFIN**	27
H-CDR1 de SEQ ID NO: 15 (Chothia)	*GYIFIDY*	28
H-CDR1 de SEQ ID NO: 16 (Chothia)	*GYIFIEY*	29
H-CDR2 de SEQ ID NO: 17 (Chothia)	*GPGSGS*	30

[00117] Las CDR anteriores de acuerdo con la numeración Chemical Computing Group (CCG) (Almagro et al., Proteins 2011; 79:3050-3066 y Maier et al, Proteins 2014; 82:1599-1610). La numeración Kabat para las secuencias se indica en negrita, y el sistema de numeración Chothia se indica en cursiva.

[00118] Humanización y variantes de secuencias de aminoácidos

[00119] Otras variantes de anticuerpos contra ANGPT2 y fragmentos de anticuerpo se pueden modificar por ingeniería genética en función del conjunto de CDR representado en SEQ ID NO: 13 a 25. Cabe destacar que, en la variante de anticuerpos contra ANGPT2 y fragmentos de anticuerpo, la secuencia de aminoácidos

de las CDR se mantiene inalterada, pero las regiones circundantes, por ejemplo, las regiones FR, se pueden modificar por ingeniería genética. Las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-ANGPT2 se pueden preparar incorporando cambios de nucleótidos adecuados en el ADN del anticuerpo anti-ANGPT2 o mediante síntesis de péptidos. Tales variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o sustituciones de residuos, y/o inserciones en estos en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-ANGPT2 de los ejemplos de la presente. Cualquier combinación de eliminaciones, inserciones y sustituciones se lleva a cabo para obtener el constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado o de su variante, tal como el cambio de la cantidad o de la posición de los sitios de glucosilación.

[00120] En algunas formas de realización, la presente invención incluye anticuerpos contra ANGPT2, o fragmentos de anticuerpo de estos, que tienen una cadena pesada variable y una cadena liviana variable, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana variable son al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 u 8; o 4 o 9; o 5 o 10; o 6 o 11; o 7 o 12, respectivamente.

[00121] En algunas formas de realización, la presente invención incluye anticuerpos anti-ANGPT2, o fragmentos de anticuerpo de estos, que tienen una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana son al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o 32; o 33 o 34; o 35 o 36; o 37 o 38; o 39 o 40, respectivamente.

[00122] Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo implica alterar el patrón de glucosilación adicional del anticuerpo. El término "alterar" en este contexto significa eliminar una o más porciones de carbohidratos que se encuentran en el anticuerpo, y/o agregar uno o más sitios de glucosilación que no estaban presentes anteriormente en el anticuerpo.

[00123] En algunos aspectos, la presente invención incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-ANGPT2 descritos en la presente. Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-ANGPT2 se preparan

mediante una variedad de métodos conocidos en el estado de la técnica. Estos métodos incluyen, entre otros, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis PCR y mutagénesis con casete de una variante preparada con anterioridad o una versión sin variante del anticuerpo anti-ANGPT2.

[00124] En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-ANGPT2 es un fragmento de anticuerpo. Existen técnicas que se desarrollaron para la producción de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos se pueden derivar mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., 1992, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; y Brennan et al., 1985, Science 229:81). De manera alternativa, los fragmentos se pueden producir directamente en células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de E. coli y acoplar químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (ver, por ejemplo, Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167). Mediante otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio.

[00125] Los anticuerpos contra ANGPT2, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, pueden incluir modificaciones.

[00126] En determinadas formas de realización, puede resultar conveniente usar un fragmento de anticuerpo anti-ANGPT2, en lugar de un anticuerpo intacto. Puede ser conveniente modificar el fragmento del anticuerpo a fin de aumentar su semivida sérica. Esto se puede obtener, por ejemplo, incorporando un epítopo de fijación al receptor de rescate en el fragmento del anticuerpo. En un método, la región adecuada del fragmento del anticuerpo se puede alterar (por ejemplo, mutar), o el epítopo se puede incorporar en una etiqueta del péptido que luego se fusiona al fragmento del anticuerpo en cualquier extremo o en el medio, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptido. Ver, por ejemplo, WO 96/32478.

[00127] En otras formas de realización, la presente invención incluye modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-ANGPT2. Las modificaciones covalentes incluyen la modificación de residuos de cisteinilo, residuos de histidilo, residuos de lisinilo y terminal amino, residuos de arginilo, residuos de tirosilo, grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo), residuos de glutaminilo y asparaginilo, o serilo, o residuos de treonilo. Otro tipo de modificación covalente incluye el acoplamiento químico o

enzimático de glucósidos al anticuerpo. Tales modificaciones se pueden obtener mediante síntesis química, o escisión enzimática o química del anticuerpo, si correspondiese. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se pueden incorporar en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos dirigidos del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos del terminal amino o carboxi.

[00128] La eliminación de cualquier porción de carbohidrato presente en el anticuerpo se puede lograr en forma química o enzimática. La desglucosilación química es descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y Edge et al., 1981, Anal. Biochem., 118:131. La escisión enzimática de las porciones de carbohidratos en los anticuerpos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas, como describen Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

[00129] Otro tipo de modificación covalente útil comprende la ligadura del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la forma establecida en una o más de la patente estadounidense N.° 4.640.835, la patente estadounidense N.° 4.496.689, la patente estadounidense N.° 4.301.144, la patente estadounidense N.° 4.670.417, la patente estadounidense N.° 4.791.192 y la patente estadounidense N.° 4.179.337.

[00130] Fijación al epítopo

[00131] En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo que reconoce un "epítopo del antígeno de ANGPT2” y "epítopo de ANGPT2” específicos. En particular, el anticuerpo de la invención se fija a un epítopo en el dominio del dominio tipo fibrinógeno (FLD) terminal de ANGPT2 humana con SEQ ID NO: 50.

[00132] En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo contra ANGTP2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en la región de aminoácidos 117-148 del dominio FLD de ANGTP2 humana (que está en el terminal C de la proteína de longitud completa de ANGPT2 humana) como se indica en SEQ ID NO: 50.

[00133] En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo contra ANGTP2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a SEQ ID NO: 51.

[00134] Las secuencias de SEQ ID NO: 50 y 51 se ilustran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Dominio FLD de ANGPT2 humana y epítopo de ANGPT2 de los anticuerpos de la invención.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
Dominio FLD de ANGTP2 humana	KEEQISFRDC AEVFKSGHTT NGIYTLTFPN STEEIKAYCD MEAGGGGWTI IQRREDGSVD FQRTWKEYKV GFGNPSGEYW LGNEFVSQLT NQQRYVLKIH LKDWEGNEAY SLYEHFYLSS EELNYRIHLK GLTGTAGKIS SISQPGNDFS TKDGDNDKCI CKCSQMLTGG WWFDACGPSN LNGMYYPQRQ NTNKFNGIKW YYWKGSGYSL KATTMMIRPA DF	SEQ ID NO: 50
epítopo de ANGTP2	YLSSEELNYR IHLKGLTGTA GKISSISQPG ND	SEQ ID NO: 51

[00135] Como se usan en la presente, las expresiones “epítopo del antígeno ANGPT2” y “epítopo de ANGPT2” se refieren a una molécula (por ejemplo, un péptido) o un fragmento de una molécula que pueden fijarse a un anticuerpo anti-ANGPT2 o un fragmento de fijación al antígeno de este. Estas expresiones también incluyen, por ejemplo, un determinante antigénico de ANGPT2 reconocido por cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención, que tiene una combinación de CDR de cadena liviana y pesada seleccionada de CDR de cadena liviana de SEQ ID NO: 18 a 25 y CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 a 17. En una forma de realización, el determinante antigénico de ANGPT2 reconocido por cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención tiene una combinación de CDR de cadena liviana y pesada seleccionada de CDR de cadena liviana de SEQ ID NO: 19 a 25 y CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 a 17.

[00136] Los epítopos del antígeno de ANGPT2 se pueden incluir en proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos o similares. En general, los epítopos son proteínas, oligopéptidos cortos, imitadores de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de fijación al anticuerpo del antígeno ANGPT2) o combinaciones de estos.

[00137] Se descubrió que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención se fijan a un epítopo único en el dominio FLD de ANGPT2 humana Preferentemente, un anticuerpo anti-ANGPT2, o fragmento de fijación al antígeno de

este, se fija a al menos un residuo de aminoácido en la región de aminoácidos del dominio FLD de ANGPT2 humana con SEQ ID NO: 50.

[00138] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos de la región de dominio FLD de ANGPT2 humana con la SEQ ID NO: 51.

[00139] Por lo tanto, en el contexto de la fijación al epítopo, la expresión "se fija en la región de aminoácidos X-Y…" significa que el anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos un residuo de aminoácidos en la región de aminoácidos especificada en la secuencia.

[00140] Si, por ejemplo, el anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de este se fija a al menos un residuo de aminoácidos en la región de aminoácidos 117 a 148, significa que el anticuerpo anti-ANGPT2, o el fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos un residuo de aminoácidos en la región de aminoácidos 117 a 148 del dominio FLD de ANPT2 humana con la SEQ ID NO: 50.

[00141] En otro aspecto, un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 117-148 del dominio FLD de ANGPT2 humana con la SEQ ID NO: 50.

[00142] La Figura 2 muestra los resultados del mapeo de epítopos para CL_209881 inicial quimérico, ANGPT2-opt-13 (un anti-ANGTP2 de ejemplo de la invención), un análogo de nesvacumab (en donde el residuo de lisina en la posición 219 se reemplaza con arginina, K219R), un análogo de MEDI3617 y LC06. Los sitios de fijación específicos de cada molécula al dominio FLD de ANGTP2 humana se resaltaron en gris oscuro. CL_209881 inicial quimérico y ANGPT2-opt-13 (que se derivó de CL_209881) se fijan a un epítopo que es distinto de los epítopos que se fijan a los anticuerpos comparadores.

[00143] Los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención bloquean la interacción física entre las células que expresan Tie2 y ANGPT2, y muestran inhibición completa de fosforilación de Tie2 mediada por oligómero de ANGPT2 de longitud completa.

[00144] Los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención son altamente selectivos. No hay fijación al dominio FLD de ANGPT1 humana detectado en la máxima concentración evaluada (500 nM). Asimismo, los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención no mostraron fijación no específica a las superficies cargadas o hidrófobas cuando se evaluaron hasta 1 μM.

[00145] Los datos de fijación muestran que los anticuerpos anti-ANGTP2 de la invención tienen alta afinidad y son altamente selectivos para bloquear ANGPT2. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención tienen alta afinidad de fijación a dominios FLD de ANGPT2 humana, de *Macaca fascicularis* y de conejo.

[00146] Dado que los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención no muestran afinidad de fijación a proteínas ANGPT2 recombinantes de ratón, los estudios de eficacia en ratón se llevaron a cabo con una molécula de herramienta de reactividad cruzada de ratón (el análogo de nesvacumab) que reconoce el dominio FLD de ANGPT2 de ratón (K_D: ~200 pM). En aquellos estudios que usan un modelo preclínico relevante para la enfermedad y desde el punto de vista mecánico (ratones UNX db/db), el tratamiento con el análogo de nesvacumab durante 8-10 semanas, y en niveles de dosis que suprimen ANGPT2 circulante libre, dio como resultado la elevación significativa de fosforilación de Tie2 glomerular y una reducción en el fenotipo de la enfermedad que incluye mejoras significativas en la estructura renal (disminuciones en la glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial).

[00147] Si bien los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención no se pudieron evaluar en ratones para reducciones en la progresión de la nefropatía, la afinidad de fijación débil de los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención al dominio FDL de ANGPT2 de rata permitió evaluar la molécula en un modelo de permeabilidad *in vivo* mecánico agudo en rata conocido como ensayo de Miles. El ensayo de Miles se beneficia de la liberación de ANGPT2 mediada por VEGF de gránulos de almacenamiento en células endoteliales que da como resultado una desestabilización vascular rápida *in vivo* y un efecto que se puede cuantificar; el modelo se validó con el análogo de nesvacumab. En el ensayo de Miles en rata, se observó el efecto anti-permeabilidad de ANGPT2-opt-13 (49 % de reducción en permeabilidad en comparación con control de IgG), lo que confirma la actividad *in vivo* de la molécula para bloquear la desestabilización vascular mediada por ANGPT2.

[00148] Las citotoxicidades de los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención se investigaron usando un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) a base de células de ANGPT2. El ensayo de CDC incluyó dos anticuerpos de reactividad cruzada contra ANGPT1/ANGPT2 (análogo MEDI3617 y LC06), un anticuerpo comparador que no tiene reacción cruzada con ANGPT1 (análogo de nesvacumab), y un anticuerpo anti-ANGPT2 de ejemplo de la invención (ANGPT2-opt-13).

[00149] Los resultados del ensayo de CDC (Figuras 1A y 1B) muestran que los

anticuerpos comparadores de reactividad cruzada contra ANGPT1/ANGPT2 (análogo de MEDI3617 y LC06) y el anticuerpo comparador específico para ANGPT2 (análogo de nesvacumab) exhiben citotoxicidades mayores que ANGPT2-opt-13.

[00150] Usos terapéuticos

[00151] En una forma de realización, los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, son útiles para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden aliviar al neutralizar ANGPT2 ("las enfermedades o los trastornos relacionados con ANGPT2").

[00152] En otra forma de realización, los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, son útiles como un medicamento.

[00153] En una forma de realización, la enfermedad o el trastorno asociado a ANGPT2 se selecciona del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, infarto del miocardio, isquemia, lesión isquémica por revascularización, hipertensión por apoplejía, hipertensión arterial pulmonar, hipertensión arterial pulmonar idiopática, trastorno cerebral inducido por traumatismo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, esclerosis múltiple, hipertensión inducida por embarazo y preeclampsia, septicemia, septicemia grave, choque septicémico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis, enfermedad por cambios mínimos, glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS), síndrome nefrótico, enfermedad renal diabética (DKD), enfermedad renal crónica (CKD), insuficiencia renal diabética, enfermedad renal terminal, isquemia o lesión isquémica por revascularización, cáncer, carcinoma hepatocelular, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), enfisema, lesiones pulmonares agudas (ALI), síndrome de enfermedad respiratoria aguda (ARDS), síndrome respiratorio agudo grave (SARS), síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS), hiperpermeabilidad vascular (y trastornos asociados), lesión renal aguda, carcinoma de células renales, insuficiencia cardíaca, nefritis lúpica, fenómeno de Raynaud, pancreatitis, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardíaca congénita, virus del dengue, malaria, hantavirus, edema, regeneración, lupus, enfermedad pulmonar intersticial, escleroderma, retinopatías, nefropatía diabética, hipertensión portal, crecimiento de várices y trasplante de hígado.

[00154] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un método para tratar NASH, cirrosis, hipertensión portal, hemorragia por ruptura de várices por crecimiento de várices y encefalopatía hepática.

[00155] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un método

para tratar la enfermedad renal crónica. La expresión “enfermedad renal crónica” se refiere por lo general a un paciente que tiene función renal reducida según se mide por la tasa de filtración glomerular (GFR). Una GFR estimada (eGFR) de 90 o más (Etapa 1) es considerada función renal normal; una eGFR de 89 a 60 (Etapa 2) es considerada pérdida leva de la función renal; una eGFR de 59 a 45 (Etapa 3a) es considerada pérdida leve a moderada de la función renal; una eGFR de 44 a 30 (Etapa 3b) es considerada pérdida moderada a grave de la función renal; y una GFR de 29 a 15 (Etapa 4) es considerada pérdida grave de la función renal.

[00156] En otra forma de realización, los pacientes con CKD tienen una relación de albúmina a creatina (UACR) de ≥ 30 mg/g y una eGFR de 20 – 75 ml/min/1,73 m^2 o 15 – 60 ml/min/1,73 m^2.

[00157] En una forma de realización, la invención se refiere al tratamiento de la enfermedad renal crónica de Etapa 2; en otra forma de realización, la invención se refiere al tratamiento de enfermedad renal crónica de Etapa 3a; en otra forma de realización, la invención se refiere al tratamiento de enfermedad renal crónica de Etapa 3b; y en otra forma de realización, la invención se refiere al tratamiento de enfermedad renal crónica de Etapa 4.

[00158] En otra forma de realización, la invención se refiere al tratamiento de enfermedad renal crónica en un paciente que tiene una ≥ eGFR 60; en otra forma de realización, la invención se refiere al tratamiento de enfermedad renal crónica en un paciente que tiene una ≥ eGFR 45; en otra forma de realización, la invención se refiere al tratamiento de enfermedad renal crónica en un paciente que tiene una ≥ eGFR 30; y en otra forma de realización, la invención se refiere al tratamiento de enfermedad renal crónica en un paciente que tiene una ≥ eGFR 20.

[00159] En otra forma de realización, la invención se refiere al tratamiento de enfermedad renal crónica en un paciente que tiene una eGFR de 20-75 ml/min/1,73 m2.

[00160] En otra forma de realización, la invención se refiere a un método para tratar la enfermedad renal crónica en un paciente que tiene una UACR de ≥ 30 mg/g.

[00161] En otra forma de realización, la invención se refiere a un método para tratar la enfermedad renal crónica en pacientes con progresión rápida (progresor rápido). Como se usa en la presente, los pacientes con CKD de progresión rápida tienen una eGFR de 20-75 ml/min/1,73 m2 y una disminución de ≥ 3 ml/min/1,73 m2/año. En otra forma de realización, los pacientes con CKD de progresión rápida tienen una eGFR de 20-75 ml/min/1,73 m2 y una disminución de ≥ 4 ml/min/1,73 m2/año.

[00162] En otra forma de realización, la invención se refiere a un método para reducir la progresión de la enfermedad renal terminal (ESRD), los eventos de diálisis y/o cardiovasculares en una paciente con CKD que tiene una eGFR de 20-75 ml/min/1,73 m2.

[00163] En otra forma de realización, la invención se refiere a un método para reducir el riesgo de un evento cardiovascular en un paciente con CKD, por ejemplo, un paciente que tiene una eGFR de 20-75 ml/min/1,73 m2.

[00164] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un método para tratar la nefropatía diabética.

[00165] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a métodos para tratar la hiperpermeabilidad vascular y/o sus trastornos asociados. Estos incluyen (i) trastornos respiratorios asociados a hiperpermeabilidad vascular no generada principalmente por una infección (Grupo 1), y (ii) trastornos respiratorios asociados a hiperpermeabilidad vascular generada por determinadas infecciones bacterianas, virales o micóticas parasitarias (Grupo 2).

[00166] Los trastornos respiratorios no limitativos asociados a hiperpermeabilidad vascular de Grupo 1 incluyen edema pulmonar (de pulmón), neumonía intersticial idiopática, IPF e IPF con exacerbación aguda, ARDS no relacionado con infección y ALI; y

[00167] Los trastornos respiratorios no limitativos asociados a hiperpermeabilidad vascular de Grupo 2 incluyen ARDS relacionado con infección, SARS, MERS, septicemia grave y choque séptico.

[00168] ARDS no relacionado con infección se refiere a ARDS que no se desencadena o se genera por una infección, tal como ARDS generado por inhalación de sustancias dañinas (por ejemplo, humo tóxico), traumatismo, pancreatitis, reflujo de jugos gástricos, transfusiones masivas de sangre o quemaduras.

[00169] ARDS relacionado con infección se refiere a ARDS que se desencadena o se genera por una infección, tal como ARDS generado por septicemia o neumonía grave.

[00170] En una forma de realización, la presente invención se refiere al tratamiento de hiperpermeabilidad vascular.

[00171] En otra forma de realización, la presente invención se refiere al tratamiento de hiperpermeabilidad vascular que surge de o se genera por, entre otras, *Legionella pneumophila, Haemophilus influenzae, Sterptococcus pneumonia, Klebsiella, Mycoplasma pneumonia*, y *Staphylococcus aureus*.

[00172] En otra forma de realización, la presente invención se refiere al tratamiento de

hiperpermeabilidad vascular que surge de o se genera por infección fúngica, que incluye, entre otras, neumonía fúngica y neumonía parasitaria.

[00173] En otra forma de realización, la presente invención se refiere al tratamiento de hiperpermeabilidad vascular que surge de o se genera por una infección viral que incluye, entre otras, infecciones por influenza H1N1, virus respiratorio sincicial, parainfluenza, adenovirus y coronavirus humanos (CoV), tales como SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV.

[00174] En otra forma de realización, la presente invención se refiere al tratamiento de hiperpermeabilidad vascular asociada a ALI, ARDS o SARS.

Usos no terapéuticos

[00175] Los anticuerpos descritos en la presente son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, tal como una resina de proteína A, usando métodos conocidos en el estado de la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína ANGPT2 (o un fragmento de esta) que se debe purificar, y posteriormente el soporte se lava con un solvente adecuado que retirará prácticamente todo el material en la muestra, excepto la proteína ANGPT2, que se fija al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado que liberará la proteína ANGPT2 del anticuerpo.

[00176] Los anticuerpos anti-ANGPT2 también son útiles en ensayos de diagnóstico para detectar y/o cuantificar la proteína ANGPT2, por ejemplo, para detectar la expresión de ANGPT2 en suero, células o tejidos específicos.

[00177] En algunas formas de realización, por ejemplo, es conveniente etiquetar el anticuerpo con una porción detectable para fines de diagnóstico. En el comercio se encuentran muchas etiquetas detectables, que incluyen radioisótopos, etiquetas fluorescentes, etiquetas de sustratos enzimáticos y similares. La etiqueta se puede conjugar indirectamente con el anticuerpo usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina, y cualquiera de las tres amplias categorías de etiquetas antes mencionadas se puede conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se fija selectivamente a la avidina y, por lo tanto, la etiqueta se puede conjugar con el anticuerpo de esta forma indirecta De manera alternativa, para lograr la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo, el anticuerpo se puede conjugar con un hapteno (tal como digoxina) pequeño, y uno de los distintos tipos de etiquetas antes mencionadas se conjuga con un anticuerpo antihapteno (por ejemplo, anticuerpo antidigoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta de la

etiqueta con el anticuerpo.

[00178] Las etiquetas de radioisótopos de ejemplo incluyen ^{35}S, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H y ^{131}I. El anticuerpo se puede etiquetar con el radioisótopo mediante las técnicas descritas, por ejemplo, en Current Protocols in Immunology, volúmenes 1 y 2, 1991, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. La radiactividad se puede medir, por ejemplo, mediante conteo de centelleo.

[00179] Los ejemplos de etiquetas fluorescentes incluyen etiquetas que derivan de quelatos terrosos raros (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamine, ficoeritrina y Texas Red, los cuales están disponibles en el comercio. Las etiquetas fluorescentes se pueden conjugar con el anticuerpo mediante técnicas conocidas, como las que se divulgan, por ejemplo, más arriba, en Current Protocols In Immunology. La fluorescencia se puede cuantificar mediante un fluorímetro.

[00180] En el estado de la técnica se conocen varias etiquetas de sustratos enzimáticos bien caracterizados (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.° 4.275.149 para obtener una reseña). En general, la enzima cataliza una alteración química de sustrato cromogénico que se puede medir usando varias técnicas. Por ejemplo, la alteración puede consistir en el cambio de color en un sustrato, que se puede medir con un espectrofotómetro. De manera alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Anteriormente se describieron técnicas para cuantificar un cambio de fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y luego puede emitir una luz que se puede medir con un quimioluminómetro, por ejemplo, o dona energía a un aceptor fluorescente.

[00181] Los ejemplos de etiquetas enzimáticas incluyen luciferasas, tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense N.° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, deshidrogenasa de malato, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos (tales como glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen, por ejemplo, en O'Sullivan et al., 1981, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, en Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73: 147-166.

[00182] Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo: Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, en donde la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de tintura, tal como ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB); fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y β-D-galactosidasa (β-D-Gal) con un sustrato cromogénico, tal como p-nitrofenil-β-D-galactosidasa o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-β-D-galactosidasa.

[00183] Muchas otras combinaciones de enzima-sustrato son conocidas por las personas del oficio de nivel medio. Para obtener una reseña general de estos, ver la patente estadounidense N.° 4.275.149 y la patente estadounidense N.º 4.318.980.

[00184] En otra forma de realización, el anticuerpo anti-ANGPT2 se usa sin etiquetar y se detecta con un anticuerpo etiquetado que se fija al anticuerpo anti-ANGPT2.

[00185] Los anticuerpos descritos en la presente se pueden usar en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de fijación competitivos, ensayos tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Ver, por ejemplo, Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Kits de diagnóstico.

[00186] Un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado se puede usar en un kit de diagnóstico, es decir, un paquete de reactivos combinados en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está etiquetado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima, tales como un precursor del sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectables. Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizadores, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o un amortiguador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los distintos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan de manera considerable la sensibilidad del ensayo. Los reactivos se pueden proveer como polvos secos, generalmente liofilizados, que incluyen excipientes que, al disolverse, proporcionarán una solución de reactivo con la concentración adecuada.

[00187] Kits de diagnóstico

[00188] Un anticuerpo anti-ANGPT2 se puede usar en un kit de diagnóstico, es decir, un paquete de reactivos combinados en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está etiquetado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima, tales como

un precursor del sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectables. Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizadores, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o un amortiguador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los distintos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan de manera considerable la sensibilidad del ensayo. Los reactivos se pueden proveer como polvos secos, generalmente liofilizados, que incluyen excipientes que, al disolverse, proporcionarán una solución de reactivo con la concentración adecuada.

[00189] Composiciones y su administración

[00190] Una composición que comprende un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener enfermedades relacionadas con ANGPT2 o trastornos descritos en la presente. La invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-ANGPT2 o un fragmento de fijación al antígeno de este en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad de ANGPT2. Como se usa en la presente, el término "sujeto" significa cualquier paciente mamífero al que se puede administrar un anticuerpo anti-ANGPT2 o un fragmento de fijación al antígeno de este, lo que incluye, por ejemplo, seres humanos y determinados mamíferos no humanos, tales como primates y perros. Los sujetos a los que se pretende tratar específicamente usando los métodos descritos en la presente incluyen los seres humanos. El anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar solo o en combinación con otras composiciones.

[00191] Los anticuerpos preferidos para usar en dichas composiciones farmacéuticas son aquellos que comprenden el anticuerpo de acuerdo con la invención.

[00192] Se conocen distintos sistemas de administración que se pueden usar para administrar el anticuerpo anti-ANGPT2 o un fragmento de fijación al antígeno de este. Los métodos de introducción incluyen, entre otros, colirios, vía intravítrea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. El anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar, por ejemplo, mediante infusión, bolo o inyección, y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. En formas de administración preferidas, la administración es mediante inyección intravítrea. Las formulaciones para tales inyecciones se pueden preparar, por ejemplo, en jeringas previamente llenadas.

[00193] Un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este,

se puede administrar como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles.

[00194] En formas de realización típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa o subcutánea a seres humanos. Generalmente, las composiciones para la administración mediante inyección son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. En los casos en que sea necesario, la composición farmacéutica también puede incluir un agente solubilizante y anestesia local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. En general, los ingredientes se suministran en forma separada o combinados en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sachet que indican la cantidad de agente activo. Cuando la composición farmacéutica se administra mediante infusión, se puede suministrar con una botella de infusión que contiene solución salina o agua estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición farmacéutica se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectar o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[00195] Además, la composición farmacéutica se puede proveer como un kit farmacéutico que comprende (a) un anticuerpo anti-ANGPT2 o un fragmento de fijación al antígeno de este en forma liofilizada y (b) un segundo recipiente que contiene un diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico (por ejemplo, agua estéril) para inyectar. El diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico se puede usar para la reconstitución o la disolución del anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de este. Opcionalmente asociado al recipiente, puede haber un aviso prescrito por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, en donde el aviso contiene la aprobación de la agencia de fabricar, usar o vender para la administración en seres humanos.

[00196] La cantidad de anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de este que es eficaz en el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos relacionados con ANGPT2 se puede determinar mediante técnicas clínicas estándares. Asimismo, se pueden usar opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los rangos de dosis óptimos. La dosis precisa que se puede usar en la

formulación también dependerá de la vía de administración y del estadio del trastorno, y debería decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de las curvas de respuesta a la dosis, derivadas de sistemas de prueba en modelos de animales o *in vitro*.

[00197] Por ejemplo, la eficacia terapéutica y de toxicidad del anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de este se puede determinar en cultivos celulares o animales experimentales mediante procedimientos farmacéuticos estándar para determinar la ED_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población). Se prefiere un anticuerpo anti-ANGPT2 o un fragmento de fijación al antígeno de este que presenta un índice terapéutico alto.

[00198] Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un rango de dosis para uso en seres humanos. La dosis del anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de este yace normalmente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango en función de la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de este usado en el método, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para alcanzar un rango de concentración en plasma circulante que incluye la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza la inhibición media máxima de síntomas) como se determina en el cultivo celular. Esta información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, ELISA y similares.

[00199] Para la inyección intravítrea del anticuerpo contra ANGPT2 generalmente se prefieren intervalos más prolongados entre tratamientos. Debido a su potencia mejorada, los anticuerpos contra ANGPT2 de la presente invención se pueden administrar en intervalos más prolongados.

[00200] En una forma de realización, el anticuerpo contra ANGPT2 se administra cada 6 semanas, o cada 7 semanas, o cada 8 semanas, o cada 9 semanas, o cada 10 semanas, o cada 11 semanas, o cada 12 semanas. En otra forma de realización, el anticuerpo contra ANGPT2 de la invención se administra una vez cada 3 meses.

[00201] Los anticuerpos de la presente invención se pueden formular en dosis que incluyen, entre otras, de 20 mg/ml a 180 mg/ml; 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50

mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml. Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención se pueden formular en una formulación líquida de alrededor de 50 mg/ml a alrededor de 150 mg/ml.

[00202] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-ANGPT2, o fragmento de fijación al antígeno de este, pueden comprender también un agente terapéutico, conjugado o no conjugado con el agente de fijación.

[00203] La administración de la terapia combinada puede tener un efecto aditivo o sinérgico en los parámetros de la enfermedad (por ejemplo, la gravedad de un síntoma, cantidad de síntomas o frecuencia de la recidiva).

[00204] Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinada, en una forma de realización específica, un anticuerpo anti-ANGPT2, o fragmento de fijación al antígeno de este, se administra de manera concurrente con un agente terapéutico. En otra forma de realización específica, el agente terapéutico se administra al menos 1 hora y hasta varios meses antes o después de la administración del anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de este, por ejemplo, al menos 1 hora, 5 horas, 12 horas, 1 día, 1 semana, 1 mes o 3 meses antes o después de la administración del anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de este.

[00205] Los compuestos de la invención se pueden usar solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos adicionales pueden incluir:

[00206] Antidiabéticos, tales como inhibidores de alfa-glucosidasa (por ejemplo, miglitol y acarbosa), análogos de amilina (por ejemplo, pramlintida), inhibidores de dipeptidil peptideasa 4 (por ejemplo, alogliptina, sitagliptina, saxagliptina, y linagliptina), miméticos de incretinas (por ejemplo, liraglutida, exenatida, dulaglutida, albiglutida, y lixisenatida), insulina, meglitinidas (por ejemplo, repaglinida y nateglinida), biguanidas (por ejemplo, metformina); inhibidores de SGLT-2 (por ejemplo, canagliflozina, empagliflozina, y dapagliflozina), sulfonilureas (por ejemplo, clorpropamida, glimepirida, gliburida, glipizida, gliburida, tolazamida y tolbutamida) y tiazolidindionas (por ejemplo, rosiglitazona y pioglitazona);

[00207] antagonistas del receptor de angiotensina II (bloqueadores del receptor de angiotensina (ARB)) tales como candesartán, eprosartán, candesartán, irbesartán, losartán, olmesartán, telmisartán, valsartán, azilsartán, y medoxomil;

[00208] inhibidores enzimáticos conversores de angiotensina (por ejemplo, benazepril,

captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, y perindopril);

[00209] anticoagulantes (por ejemplo dabigatrán, Actylise, warfarina, heparina, y ácido acetilsalicílico);

[00210] broncodilatores que incluyen beta-agonistas de acción corta y prolongada (por ejemplo, albuterol, levalbuterol, salmeterol, formoterol, arformoterol, vilanterol, indacaterol y olodaterol) y anticolinérgicos de corta y larga acción (ipratropio, tiotropio, umeclidinio, glicopirrolato y aclidinio);

[00211] esteroides tales como fluticasona y budesonida;

[00212] fármacos antimaláricos tales como hidroxicloroquina o cloroquina;

[00213] análogos de nucleósidos virostáticos tales como remdesivir; e

[00214] inhibidores de VIH proteasa tales como lopinavir-ritonavir;

[00215] Polinucleótidos, vectores, células huésped y métodos recombinantes

[00216] La presente invención se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-ANGPT2, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo. Los polinucleótidos aislados pueden codificar cualquier forma deseada del anticuerpo anti-ANGPT2 que incluye, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de longitud completa, los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

[00217] Los polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-ANGPT2, o un fragmento o cadena de este se pueden fusionar con una o más secuencias reguladoras o de control, como se conocen en el estado de la técnica, y se pueden contener en vectores de expresión o células huésped adecuadas, como se conoce en el estado de la técnica. Cada una de las moléculas de polinucleótidos que codifican los dominios variables de las cadenas pesada y liviana se pueden fusionar independientemente con una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio constante, tal como un dominio constante humano, lo que permite la producción de anticuerpos intactos. De manera alternativa, los polinucleótidos, o las porciones de estos, se pueden fusionar juntos, lo que permite proporcionar un modelo para la producción de anticuerpos monocatenarios.

[00218] Para la producción recombinante, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se inserta en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Se encuentran disponibles diversos vectores adecuados para expresar el anticuerpo recombinante. Los componentes del vector, en general, incluyen, entre

otros, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento mejorador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

[00219] Los anticuerpos anti-ANGPT2 también se pueden producir como polipéptidos de fusión, en donde el anticuerpo se fusiona con un polipéptido heterólogo, tal como una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el terminal amino del polipéptido o de la proteína madura. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es, en general, una reconocida y procesada (es decir, escindida mediante una peptidasa de señal) mediante la célula huésped. En el caso de las células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia de señal del anticuerpo anti-ANGPT2, la secuencia de señal se puede sustituir mediante una secuencia de señal procariótica. La secuencia de señal puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina, penicilinasa, lipoproteína, líderes de enterotoxina termoestable II, y similares. En el caso de secreción de levadura, la secuencia de señal natural se puede sustituir, por ejemplo, con una secuencia líder obtenida del factor alfa invertasa de levadura (que incluye líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), fosfatasa ácida, glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en WO90/13646. En células de mamífero, se pueden usar las secuencias de señales de mamíferos, así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora está ligado en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado.

[00220] Los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Estas secuencias son conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2-υ. es adecuado para la levadura, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV y BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse, en general, solo porque contiene el promotor temprano).

[00221] Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen que codifica un marcador seleccionable para facilitar la identificación de la expresión. Los genes

marcadores seleccionables habituales codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, o de manera alternativa, son deficiencias auxotróficas del complemento, o en otras alternativas, suministran nutrientes específicos que no están presentes en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[00222] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, por ende, sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina. Los marcadores seleccionables comunes de células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado, tal como DHFR (dihidrofolato reductasa), timidina quinasa, metalotioneína-I y -II (tales como genes de metalotioneína de primates), adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa y similares. Las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican, primero, mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se usa DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) con deficiencia de actividad DHFR (por ejemplo, DG44).

[00223] De manera alternativa, las células huésped (en particular, los huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican anticuerpo anti-ANGPT2, la proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH), se pueden seleccionar mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección del marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.965.199.

[00224] Cuando la producción recombinante se realiza en una célula de levadura como célula huésped, el gen TRP1 presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) se puede usar como un marcador seleccionable. El gen TRP1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que no tiene la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N.° 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). La presencia de una lesión trp1 en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona un entorno eficaz

para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia del triptófano. En forma similar, las cepas de levadura con deficiencia de Leu2p, tales como ATCC 20.622 y 38.626 se complementan mediante plásmidos conocidos que tienen el gen LEU2.

[00225] Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 µm pKD1 se pueden usar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De manera alternativa, un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante se informó en *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). También se divulgaron vectores de expresión estables de copias múltiples para la secreción de albúmina de suero recombinante madura humana mediante cepas industriales de *Kluyveromyces* (Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

[00226] Los vectores de expresión y clonación, por lo general, contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped, y está ligado operativamente a la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-ANGPT2 o cadena de polipéptidos de aquel. Los promotores adecuados para usar con huéspedes procarióticos incluyen el promotor phoA, los sistemas promotores de β-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos, tales como el promotor tac. Otros promotores bacterianos conocidos también son adecuados. Los promotores para usar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgamo (S.D.) ligada operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-ANGPT2 humanizado.

[00227] Se conocen muchas secuencias del promotor eucariótico. Prácticamente, todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos, se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas aquellas secuencias se insertan de manera adecuada en los vectores de expresión eucarióticos.

[00228] Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para usar con huéspedes de la levadura incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa,

fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

[00229] Los promotores inducibles tienen la ventaja adicional de transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento. Estos incluyen regiones promotoras de levadura para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas derivativas asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para usar en la expresión de levadura también se describen en EP 73.657. Los mejoradores de levadura también se usan en forma conveniente con promotores de levadura.

[00230] La transcripción del anticuerpo anti-ANGPT2 de vectores en células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus de polioma, virus de difteria aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus del simio 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina o de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

[00231] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la patente estadounidense N.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente estadounidense N.º 4.601.978. Ver también Reyes et al., 1982, Nature 297:598-601, que divulgan la expresión de cADN de interferón p humano en las células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. De manera alternativa, se puede usar la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous como promotor.

[00232] Otro elemento útil que se puede usar en un vector de expresión recombinante es una secuencia potenciadora, que se usa para aumentar la transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo anti-ANGPT2 mediante eucariotas superiores. En la actualidad, se conocen varias secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). Sin embargo, en general, se usa un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el último sitio del origen de replicación (bp 100-270),

el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el último sitio del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Ver también Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 para obtener una descripción de elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador se puede escindir en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia que codifica el anticuerpo anti-ANGPT2, pero preferentemente se ubica en el sitio 5' del promotor.

[00233] Los vectores de expresión que se usan en las células huésped eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del mARN. En general, estas secuencias se encuentran disponibles en las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o cADN eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcriptos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mARN que codifica el anticuerpo anti-ANGPT2. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Ver WO94/11026 y el vector de expresión allí divulgado. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-ANGPT2 se pueden expresar usando el sistema CHEF. (Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.° 5.888.809, cuya divulgación se incorpora por referencia en la presente.)

[00234] Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente son las células procariotas, de levadura o eucarióticas superiores descritas anteriormente. Las procariotas adecuadas para ello incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium, Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P divulgado en DD 266.710 que se publicó el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque también son adecuadas otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos.

[00235] Además de los procariotas, los microbios eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican el anticuerpo anti-ANGPT2. *Saccharomyces cerevisiae*,

comúnmente conocido como levadura de panadería, es el más habitual entre los microorganismos huésped eucarióticos inferiores. Sin embargo, hay varios géneros, especies y cepas diferentes generalmente disponibles y útiles en la presente, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis, K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; yarrowia (EP 402,226); *Pichia pastors* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* y huéspedes de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

[00236] Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-ANGPT2 glucosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos, que incluyen, por ejemplo, numerosas cepas y variantes baculovirales, y las correspondientes células huésped permisivas de insectos de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de la seda). En el comercio se encuentran varias cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de Autographa californica NPV y la cepa Bm-5 de Bombyx mori NPV; se pueden usar esos virus, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[00237] Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, papa, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden usar como huéspedes.

[00238] Los anticuerpos anti-ANGPT2 inventivos, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, también se pueden incorporar en vectores virales, es decir, el polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de este se introduce en el vector viral y luego se expresa en el cuerpo del paciente después de la infección por el virus.

[00239] En otro aspecto, la expresión de anti-ANGPT2 se realiza en las células de vertebrados. La propagación de las células de vertebrados en el cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina, y las técnicas se usan ampliamente. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para la proliferación en cultivo de suspensión (Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), células de riñón de hámster

bebé (BHK, ATCC CCL 10), células de ovarios de hámster chino/-DHFR1 (CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; por ejemplo, DG44), células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70), células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2), células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75), células de hígado humano (Hep G2, HB 8065), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51), células TR1 (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), células MRC 5, células FS4 y línea de hepatoma humano (Hep G2).

[00240] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación antes descritos para la producción de anticuerpos anti-ANGPT2 y se cultivan en un medio de nutrientes convencional modificado convenientemente para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes que codifican las secuencias deseadas.

[00241] Las células huésped que se usan para producir un anticuerpo anti-ANGPT2 descrito en la presente se pueden cultivar en varios medios. Los medios disponibles en el comercio, tales como Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.) y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, se puede usar cualquiera de los medios descritos en uno o más de Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, patente estadounidense N.° 4.767.704, patente estadounidense N.° 4.657.866, patente estadounidense N.° 4.927.762, patente estadounidense N.° 4.560.655, patente estadounidense N.° 5.122.469, WO 90/103430 y WO 87/00195, como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores del crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), amortiguadores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos que están presentes, en general, en concentraciones finales en el rango micromolar), glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros complementos en concentraciones adecuadas conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Las condiciones del cultivo, tales como temperatura, pH y

similares, son las que se usaron previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para la persona del oficio de nivel medio.

[00242] Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir de manera intracelular, en el espacio periplásmico, o se puede segregar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de manera intracelular, las células se pueden alterar para liberar proteína como primera etapa. Los residuos de partículas, ya sea células huésped o fragmentos lisados, se pueden retirar, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167 describen un proceso para aislar anticuerpos que son segregados al espacio periplásmico de *E. coli*. En síntesis, la pasta celular es descongelada en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) durante alrededor de 30 minutos. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo es segregado en el medio, los sobrenadantes de esos sistemas de expresión en general primero se concentran usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, se puede incluir en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para evitar el desarrollo de contaminantes no previstos. Se pueden usar varios métodos para aislar el anticuerpo de la célula huésped.

[00243] La composición de anticuerpos preparada de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía por afinidad; la cromatografía por afinidad es una técnica de purificación típica. La conveniencia de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas gamma1, gamma2 o gamma4 humanas (ver, por ejemplo, Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para gamma3 humana (ver, por ejemplo, Guss et al., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). Una matriz a la que se une un ligando de afinidad es, con frecuencia, agarosa, pero también hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio poroso controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También hay otras técnicas disponibles para la purificación de las proteínas, tales como

fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, según el anticuerpo que se desee recuperar.

[00244] Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un amortiguador de elución a un pH de alrededor de 2,5 a 4,5, lo cual se realiza, en general, con bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal a alrededor de 0-0,25 M).

[00245] También se incluyen ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de rigurosidad baja, moderada y alta, como se define en la presente, con la totalidad o con una porción (por ejemplo, la porción que codifica la región variable) de la secuencia de nucleótidos representada por secuencias de polinucleótidos aisladas que codifican un anticuerpo contra ANGPT2 o un fragmento de anticuerpo. La porción de hibridación del ácido nucleico que se hibrida tiene, en general, una longitud de al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30 o 50) nucleótidos. La porción de hibridación del ácido nucleico que se hibrida es al menos 80 %, por ejemplo, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntica a la secuencia de una porción o la totalidad de un ácido nucleico que codifica un polipéptido anti-ANGPT2 (por ejemplo, una región variable de la cadena pesada o cadena liviana) o su complemento. Los ácidos nucleicos de hibridación del tipo que se describe en la presente se pueden usar, por ejemplo, como sonda de clonación, cebador, por ejemplo cebador de PCR, o sonda de diagnóstico.

[00246] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden:

una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 31 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 3; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 32 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 8,

o

un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 33 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 4; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 34 o una región variable de la

cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 9,

o

un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 35 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 5; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 36 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 10,

o

un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 37 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 6; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 38 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 11,

o

un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 39 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 7; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 40 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 12.

[00247] Se entiende que en los anticuerpos anti-ANGPT2 o fragmentos de anticuerpo la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las CDR se mantiene inalterada (con respecto al aminoácido que codifican, son posibles los equivalentes de la secuencia de ADN debido a la degeneración de codones) pero las regiones circundantes, por ejemplo, las regiones FR, se pueden modificar por ingeniería genética.

[00248] Artículos de fabricación

[00249] En otro aspecto, se incluye un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica. El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de este. La etiqueta que se encuentra

sobre el recipiente o que está asociada a este indica que la composición se usa para tratar la afección determinada. El artículo de fabricación también puede comprender un segundo recipiente que comprende un amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como una solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

[00250] La invención también se describe en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención.

[00251] EJEMPLOS

[00252] Los anticuerpos ANGPT2-opt-1, ANGPT2-opt-2, ANGPT2-opt-13, ANGPT2-opt-19, y ANGPT2-opt-31 se caracterizan junto con anticuerpos comparadores análogos de nesvacumab, análogo de MEDI3617 y LC06. Estos anticuerpos comparadores se produjeron con el uso de procedimientos estándar a base de secuencias publicadas como se describe a continuación.

Tabla 4. Anticuerpos anti-ANGPT2 comparadores.

Anticuerpo comparador	Secuencia publicada
Análogo de nesvacumab (Regeneron) Cadena pesada: SEQ ID NO: 53 Cadena liviana: SEQ ID NO: 54	Ver el número de archivo ZZ-34 del Consejo de nombres adoptados de los Estados Unidos de América (USAN) (2012) para nesvacumab. En el caso del análogo de nesvacumab descrito en la presente, el residuo de lisina en la posición 219 en la cadena pesada de nesvacumab se reemplaza con arginina (K219R).
Análogo de MEDI3617 (Medimmune) Cadena pesada: SEQ ID NO: 55 Cadena liviana: SEQ ID NO: 56	La estructura del análogo de MEDI3617 usada en la presente se basa en la descripción de la patente estadounidense N.º 8.507.656.
LC06 (Roche) Cadena pesada: SEQ ID NO: 57 Cadena liviana: SEQ ID NO: 58	La estructura de LC06 usada en la presente se basa en la descripción de la patente estadounidense N.º 9.340.609.

[00253] Los datos de estos anticuerpos se describen a continuación.

[00254] Ejemplo 1: Generación de anticuerpos (inmunización)

[00255] Los ratones CD1 de tipo silvestre se inmunizaron con ADN ANGPT2 humano

y murino recombinante, así como la proteína ANGPT2 humana y murina. Como adyuvantes se usaron el adyuvante de Freund completo, el adyuvante de Freund incompleto, Titermax o Gerbu en varios puntos para aumentar las respuestas al anticuerpo. La serología se evaluó luego mediante ELISA. Se administró a los ratones que dieron positivo en el estudio serológico un refuerzo final antes del aislamiento de linfocitos B. Los ratones seleccionados exhibieron títulos de anticuerpo positivos en el suero. Al finalizar el régimen de inmunización, se recolectaron los esplenocitos para la recuperación de linfocitos B específicos contra el antígeno.

[00256] Ejemplo 2. Producción de anticuerpos humanizados

[00257] Se seleccionó CL-209881_VL inicial quimérico para una optimización adicional. El anticuerpo quimérico inicial tuvo una cadena liviana variable correspondiente a SEQ ID NO: 2 y una cadena pesada variable correspondiente a SEQ ID NO: 1. Se seleccionaron y optimizaron 33 secuencias (iniciales). Se realizaron estudios posteriores para la selección de 6 anticuerpos para un aumento adicional.

[00258] Ejemplo 3. Características no deseadas de las secuencias en las CDR

[00259] Las secuencias de las CDR se revisaron para determinar la presencia de cualquier posible característica no deseada, tal como sitios de N-glicosilación, motivos de desamidación fuertes (NG, NS, NH, NA, ND, NT, NN), motivos de isomerización de aspartato (DG), motivos de fragmentación (DG, DS), cisteína. Estos aminoácidos o motivos pueden experimentar una reacción química y proporcionar heterogeneidad no deseada al producto, también con la posibilidad de generar un impacto negativo en la fijación y función dianas. Por este motivo, se prefiere eliminar dichos aminoácidos o motivos (si los hubiera) de las CDR.

[00260] Ejemplo 4. Inmunogenicidad

[00261] La inmunogenicidad de las secuencias se evaluó *in silico* con un algoritmo proporcionado a través de la compañía con licencia EpiVax, Inc., Providence, Rhode Island. El puntaje EpiMatrix ajustado a Treg consideró los epítopos de linfocitos T y los epítopos de Treg. A menor puntaje de inmunogenicidad, menor posibilidad de que una secuencia sea inmunógena. En general, se considera un puntaje negativo como un riesgo bajo de inmunogenicidad, mientras que un puntaje positivo es visto como una indicación de inmunogenicidad potencial.

[00262] Ejemplo 5. Información de epítopo

[00263] Materiales

[00264] Agua (Sigma Aldrich, P/N 37877-4L)

[00265] Acetonitrilo (Sigma Aldrich, P/N 34998-4L)

[00266] Ácido fórmico (Fluka, P/N 94318)

[00267] Urea (Sigma Aldrich, P/N 51456-500G)

[00268] TCEP-HCl - 10 g (Thermo Scientific - Pierce, P/N 20491)

[00269] Fosfato de sodio dibásico (Sigma Aldrich, P/N S7907-100G)

[00270] Fosfato de sodio monobásico (Sigma Aldrich, P/N S8282 - 500G)

[00271] Precolumna ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 5 mm (Waters Technologies Corp, 186003975)

[00272] Cartucho de pepsina inmovilizada Poroszyme®, 2,1 mm x 30 mm (Life Technologies Corp, 2313100)

[00273] Columna Acquity UPLC BEH C18, 1,7um, 1mm X 50 mm (Waters, 186002344)

[00274] Solvente A: 0,1 % de ácido fórmico /99 % de agua/1 % de acetonitrilo

[00275] Solvente B: 0,1 % de ácido fórmico /5% de agua/95% de acetonitrilo

[00276] Amortiguador de agua: 10 mM de H2O, fosfato de sodio pH 7,4

[00277] Amortiguador de deuterio: 10 mM de D2O, fosfato de sodio pH 7,4

[00278] Amortiguador de inactivación: Agua, urea 8 M, TCEP-HCl 0,4 M

[00279] En las muestras de control de mapeo de epítopos, el antígeno se probó con y sin el anticuerpo. Para determinar la lista de péptidos antigénicos, se utilizó primero este protocolo usando amortiguador de agua en lugar de amortiguador de deuterio. Se mezclaron 4 µl de la muestra con 40 µl de amortiguador de deuterio. Esta mezcla se incubó a 20 °C durante múltiples puntos temporales (1, 2 y 4 minutos). Luego, se transfirieron 40 µl de la mezcla a 40 µl del amortiguador de inactivación a 4 °C (Urea 4M, Tcep-HCl 0,4M) y se mezcló. Se inyectaron 60 µl de la proteína inactivada, la cual se digirió en la columna de pepsina durante 2 minutos haciendo fluir 200 µl/ml del solvente A: 0,1 % de ácido fórmico /99 % de agua/1 % de acetonitrilo Los péptidos siguientes se desalaron en la precolumna Vanguard durante 3 minutos. Los péptidos pépticos se enviaron a una columna de fase inversa BEH C18 dentro del compartimento de temperatura controlada de válvula/columna. Se utilizó un sistema de solventes de gradiente que consistía en el solvente A: 0,1 % de ácido fórmico /99 % de agua /1 % de acetonitrilo y solvente B: 0,1 % de ácido fórmico /5 % de agua/95 % de acetonitrilo El porcentaje de solvente B aumentó de 10 % a 15 % a los 5,1 minutos, a 50 % a los 11 minutos, a 90 % a los 11,5 minutos, que se mantuvo hasta los 12,5 minutos, a 0 % de B a los 13 minutos, que se mantuvo hasta los 14 minutos. La separación cromatográfica se produjo a 4 °C a una velocidad de flujo de 180 µl/min. Luego de la separación cromatrográfica, la muestra se introdujo en un espectrómetro

de masa Thermo Scientific Orbitrap Fusion operado en modo de ionización positiva de electrospray. El método utilizado incluyó tipos de activación de CID y ETD cuando se identificaron los péptidos de control, utilizando una resolución de 120.000, una señal mínima de 10.000, un ancho de aislamiento de 1,0 y una energía de colisión normalizada de 35,0 V. El nivel de RF de lentes S se estableció en 60 %. El tipo de recolección de datos para los péptidos de control es perfil para el barrido de MS completo y centroide para los datos de CID MS/MS. Para las muestras deuteradas, no se recolectó MS/MS. Los datos se recolectaron en un rango de masa de 280-1800 Da. Para el análisis de los datos de fragmentación de LC-MS/MS sin procesar, las muestras de control (con CID y ETD MS/MS) se analizaron utilizando Proteome Discover 1.4 (Thermo Scientific) y PMi Byonic (Protein Metrics) en comparación con la secuencia proporcionada para generar una lista de péptidos y tiempos de retención. Los archivos de los datos brutos se procesaron previamente y se convirtieron a formato ASCII utilizando el *software* interno registrado SHARC. Los péptidos identificados luego se emparejaron y se sintetizaron utilizando el *software* interno registrado SHAFT. Los epítopos se determinaron mediante las diferencias en el cambio de masa promedio inducido por la fijación luego del etiquetado con deuterio. A nivel peptídico, la protección mayor de 0,4 Da fue considerada significativa.

[00280] Los resultados del mapeo de epítopos se mostraron para un anticuerpo ejemplar de la invención (ANGPT2-opt-13) (Figura 2), el análogo de nesvacumab, el análogo de MED3617 y LC06. Según se informó, nesvacumab no tuvo reacción cruzada con ANGPT1, mientras se informó que el análogo de MED3617 y LC06 tuvo reacción cruzada con ANGPT1. Los sitios de fijación específicos de los anticuerpos al dominio de FLD de ANGPT2 humana con SEQ ID NO: 50 (Figura 2) se resaltaron en gris oscuro. Los datos mostraron que los anticuerpos comparadores (análogos de nesvacumab, MED3617, y LC06) se fijaron a epítopos que son diferentes y que se distinguen del epítopo de fijación de ANGPT2-opt-13.

[00281] Ejemplo 6. Ensayo de CDC

[00282] La región Fc de la cadena pesada de IgG confiere funciones efectoras del anticuerpo a través de la interacción con C1q y por lo tanto puede tener la capacidad de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este efecto se puede investigar *in vitro* al exponer las células diana para complementarse en la presencia de un anticuerpo que se fija específicamente a la célula diana. El ensayo de CDC se puede usar para evaluar la actividad de los anticuerpos monoclonales para mediar CDC. (Ver “Mapping of the C1q binding site on Rituxan, a chimeric antibody with a

human IgG1 Fc" Idusogie, Esohe E. et al., Journal of Immunology (2000), 164 (8), 4178-4184; y "Utilization of Complement-Dependent Cytotoxicity To Measure Low Levels of Antibodies: Application to Nonstructural Protein 1 in a Model of Japanese Encephalitis Virus," Konishi, Eiji et al., Clin Vaccine Immunol. (2008) enero; 15(1): 88–94.)

[00283] Las células CHO que expresaron ANGPT2 humana unida a la membrana (CHO-GPI-ANGPT2) se cultivaron en RPMI-1640 con la adición de HI FBS, 1x de glutamax y 1000 µg/ml de Geneticin (usada como células diana). La actividad de CDC se determinó mediante la medición de la liberación de LDH de células diana con el uso del kit Plus de detección de citotoxicidad de Roche®. Las muestras se prepararon en triplicado en placas de fondo redondo de 96 cavidades. Las muestras consistieron en 50 µl de anticuerpo, 50 µl de células diana (50.000/cavidad), y 100 µl de complemento humano (Cedarlane®), a 1:12 de dilución final en medio citotóxico (Cedarlane®). El control de fondo es de 200 µl de medio de citotoxicidad (Cedarlane®) solo. El control de liberación máxima (Tmáx) es de 50 µl de células diana y 150 µl de medio de citotoxicidad. El control de células diana (T espontáneo, Tespon) es de 50 µl de células diana y 150 µl de medio de citotoxicidad. La placa se incubó a 37 ºC en una incubadora de CO_2 húmeda durante 3 horas. Treinta minutos antes de la finalización de la incubación (después de una incubación de 2,5 h), se agregaron 10 µl de solución de lisis (proporcionada en el kit de detección de citotoxicidad Roche®) a las cavidades de control de liberación máxima (Tmáx). Al finalizar la incubación, se transfirieron 100 µl de los sobrenadantes a las cavidades correspondientes de una placa de fondo plano de 96 cavidades para la detección de LDH. Se agregaron 100 µl de la mezcla de reacción (proporcionada en el kit de detección de citotoxicidad) a cada cavidad y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 min en la oscuridad. Al finalizar la segunda incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de solución de detención (proporcionada en el kit de detección de citotoxicidad). Se midió la absorbancia en la longitud de onda de 490 nm con 650 nm como referencia en el lector de placas Biotek® (Biotek, Synergy). El % de CDC se calculó usando la siguiente ecuación:

[00284] % de CDC=((liberación inducida de Ab)-[(T)_espon])/((T_máx)-(T_espon))*100

[00285] El estudio de CDC descrito anteriormente se usó para determinar los resultados de citotoxicidades de anticuerpos anti-ANG: ANGPT2-opt-13-IgG, análogo de nesvacumab, análogo de MEDI3617 y LC06. Los resultados de los estudios

duplicados se muestran en las Figuras 1A y 1B. Los resultados muestran que el anticuerpo anti-ANGPT2 de ejemplo de la invención (ANGPT2-opt-13-IgG) es menos citotóxico que cada análogo de nesvacumab, análogo de MEDI3617 y LC06.

[00286] Ejemplo 7. Ensayo de bloqueo de ANGPT2

[00287] El dímero ANGPT2 humano (CC-FLD) se preincubó con los anticuerpos de prueba. La mezcla de ANGPT2/anticuerpo se incubó luego con células HEK293 Tie2 humanas a 4 ^{o}C. Después de lavarlas, las células se tiñeron con anti-His-AF647 (de GenScript) para la detección de la etiqueta His en la proteína ANGPT2. La fijación de ANGPT2 a células Tie2 humanas etiquetada en segundo lugar se detectó mediante citometría de flujo. El promedio de los valores duplicados para cada punto de concentración se usó para derivar los gráficos de ajuste de curva. Se consideraron anticuerpos de bloqueo a los anticuerpos que impiden que ANGPT2 se fije a las células Tie2. Los resultados se muestran en las Figuras 3A-3G y los valores de EC50 se muestran en la Tabla 5 en función del promedio de los valores duplicados.

Tabla 5. Ensayo de bloqueo de ANGPT2.

Anticuerpo anti-ANGPT2	EC50, nM
Ang2-opt-1	13,22
Ang2-opt-2	14,81
Ang2-opt-13	12,98
Ang2-opt-19	15,08
Ang2-opt-31	13,03
Análogo de nevescumab	3,77

[00288] Los resultados del ensayo de bloqueo de ANGPT2 mostraron que los anticuerpos de la invención bloquearon la interacción de ANGPT2 con la Tie2 receptora en la superficie celular.

[00289] Ejemplo 8. Ensayo funcional de fosforilación de Tie2

[00290] El ensayo funcional de fosforilación de Tie2 se llevó a cabo como se describe a continuación.

[00291] A menos que se indique lo contrario, se usaron los siguientes reactivos o materiales:

[00292] HEK293/células huTie2;

[00293] 0,25 % de tripsina/EDTA (Gibco N.º de cat. 25200-056);

[00294] Placas negras, recubiertas con poli-D-lisina, de fondo transparente de 96 cavidades/placa (BioCoat N.° de cat. 35460);

[00295] Amortiguador de lisis para ELISA sándwich PathScan (señalización de células, N.° de cat. 7018);

[00296] Cóctel de inhibidores de fosfatasa y proteasa Halt (Thermo Scientific, N.° de cat. 78443, lote N.° QK226996, reserva 100x);

[00297] Ortovanadato de sodio activado, 200 mM de reserva (cinco fotones, N.° de cat. ActVO-4, lote N.° 26716-4);

[00298] Microplacas de poliestireno de alta fijación de 96 cavidades transparentes (R&D Systems N.° de cat. DY990, lote N.° 316940);

[00299] Amortiguador de bloqueo ELISA: Solución salina amortiguada con fosfato (PBS) c/2 % de BSA, diluida de 10 % de reserva (R&D Systems, N.° de cat. DY995);

[00300] Diluyente de ensayo ELISA: PBS c/1 % de BSA, diluida de 10 % de reserva (R&D Systems, N.° de cat. DY995);

[00301] Concentrado de amortiguador de lavado ELISA: 25X de reserva (R&D Systems, N.° de cat. WA126);

[00302] Paquete de reactivo de sustrato de ELISA (R&D Systems, N.° de cat. DY999);

[00303] Solución de detención de ELISA (R&D Systems, N.° de cat. DY994); y

[00304] rhangiopoyetina-2 (R&D systems N.° de cat. 623-AN/CF; lote N.° SUL61 en 169 ug/ml de reserva).

[00305] *Medios para colocación de células en placas*:

[00306] Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con 4,5 g/l de glucosa con L-glutamina (500 ml) (Gibco N.° de cat. 11995-065);

[00307] Suero bovino fetal (FBS) (50 ml) (Hyclone N.° de cat. SH30071.03, lote N.° AC10219630);

[00308] 100 mM de solución de aminoácidos no esenciales (5ml) (NEAA) (Gibco: N.° de cat. 11140-050);

[00309] 100 mM de piruvato de sodio (5 ml) (Gibco N.° de cat. 11360-070);

[00310] PenStrep (5 ml) (Gibco N.° de cat. 15140-122); y

[00311] 1M de ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N-2-etansulfónico (Hepes) (6,25 ml) (Gibco N.° de cat. 15630-080); Geneticin (10 ml) (Gibco N.° de cat. 10131-035).

[00312] *Medios de privación*:

[00313] DMEM con 4,5g/l de glucosa con L-glutamina;

[00314] 5 % de FBS (25 ml); NEAA (5 ml);

[00315] Piruvato de sodio (5 ml); PenStrep (2,5 ml);

[00316] Hepes (6,25 ml); y

[00317] Geneticin (10 ml), solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco

(dPBS), libre de calcio y magnesio (Gibco N.° de cat. 14190).

[00318] *Colocación de células en placas*

[00319] Las células HEK293/huTie2 se lavaron con PBS, se desprendieron con 0,25 % de tripsina y se hizo un recuento usando un contador de células Countess (Invitrogen). $5x10^4$ de células se colocaron en placas por cavidad en una placa de cultivo tisular de fondo transparente de 96 cavidades con poli-D-lisina en 100 ul de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con 10 % de FBS, NEAA, piruvato de sodio, PenStrep, Geneticin y HEPES. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C, incubadora con 5 % de CO_2. Luego de alrededor de 18 horas, el medio para colocación de células en placas se reemplazó por 100 ul de medio de privación (medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con 5 % de FBS, NEAA, piruvato de sodio, PenStrep, Geneticin y HEPES, se volvió a colocar la placa en la incubadora y se incubó durante la noche.

[00320] *Recubrimiento de placas de ELISA*

[00321] El anticuerpo de captura (antiTie2 (AB33) de señalización celular) se diluyó hasta una solución de trabajo de 1ug/ml en amortiguador de recubrimiento (eBioscience). La solución de trabajo se agregó inmediatamente a una microplaca de poliestrireno de alta fijación de 96 cavidades (R&D) para obtener 100 ul por cavidad. Se sellaron las cavidades de las placas y se incubaron durante la noche a 4 °C. La placa se lavó 3 veces con 300 ul por cavidad mediante amortiguador de lavado 1XELISA y luego se bloqueó con 200 ul de amortiguador de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente con agitación.

[00322] *Tratamiento de células*

[00323] Se diluyó una solución de reserva de Ang2 (rhangiopoyetina-2 de R&D systems N.° de cat. 623-AN/CF; lote N.° SUL61) a 6 ug/ml en medio de privación. (El medio de privación también se usa como diluyente de anticuerpo). De manera separada, las soluciones de los anticuerpos anti-ANGPT2 se prepararon mediante la dilución a 66 nM y luego la dilución 1:3 en serie a 0,27 nM. Los anticuerpos anti-ANGPT2 con rhAng2 se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Los medios de cultivo celular (50 ul) se retiraron de cada cavidad en la placa celular. Las células se trataron con 50 ul de alícuotas de la solución del anticuerpo anti-ANGPT2 preincubado durante 20 minutos a 37 °C, en incubadora con 5 % de CO_2. El sobrenadante se descartó y las células se lavaron una vez con PBS frío (que contenía 1 mM de ortovanadato de sodio activado). El amortiguador de lavado se descartó y el amortiguador de lisis PathScan (señalización de células) con 1 mM de ortovanadato de

sodio activado, inhibidores de proteasa y fosfatasa) se agregó a cada célula. La placa se agitó a gran velocidad durante 1-3 h a 4 °C.

[00324] *ELISA*

[00325] El amortiguador de bloqueo se retiró de la placa de ELISA, se agregó a cada cavidad lisado celular, y la placa se incubó durante la noche a 4 °C con agitación. La placa se lavó cuatro veces con amortiguador de lavado ELISA, y cada cavidad se trató con anticuerpo de detección: Conjugado-4G10 anti-fospotirosina de platino Biotin (de Millipore) a 1:300 de dilución en diluyente de ensayo ELISA. La placa se incubó durante 2 h en el agitador a temperatura ambiente y luego se lavó cuatro veces con amortiguador de lavado ELISA. El conjugado estreptavidina-HRP (de Millipore) diluido a 1:300 en diluyente de ensayo ELISA se agregó en cada cavidad y se incubó en un agitador durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó cuatro veces con amortiguador de lavado ELISA. Luego de la etapa de lavado, la solución de sustrato del paquete de reactivo de sustrato de ELISA (R&D Systems) se agregó a cada cavidad a temperatura ambiente durante 5-10 min. La solución de detención se agregó seguida de golpes suaves durante 5 minutos para garantizar una mezcla completa. La placa se leyó luego con un lector de placas con absorbancia a 450 nm corregida con 650 nm.

Tabla 6. Ensayo funcional de fosforilación de Tie2.

Anticuerpo anti-ANGPT2	EC50, nM	EC50, nM
Ang2-opt-1	3,0	3,2
Ang2-opt-2	1,8	1,9
Ang2-opt-13	4,2	4,0
Ang2-opt-19	5,0	4,6
Ang2-opt-31	4,4	3,8
Ang2-opt-34	5,8	7,4
Análogo de nevescumab	4,4	2,2
Análogo de MEDI3617	-	2,7
LC06	1,3	-

[00326] Los resultados del ensayo funcional de Tie2 muestran que los anticuerpos anti-ANGPT2 inhibieron la fosforilación de Tie2 inducida por ANGPT2 y pudieron bloquear la fosforilación mediada por Tie2 y la señalización corriente abajo.

[00327] Ejemplo 9. Afinidad de fijación

[00328] La afinidad de fijación a los diversos analitos de ANGPT2 se determinó

mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) con el uso de ProteOn XPR36 (Bio-Rad). A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos se obtuvieron de Bio-Rad. El amortiguador de corrida para todos los ensayos y diluciones (excepto cuando se indique) es solución salina amortiguada con fosfato (PBS)/ácido etilendiamintetraacético (EDTA) con 0,01 % de Tween20 (PBS-T-EDTA). PBS-T-EDTA se preparó agregando 100 µl de 100 % de Tween20 a 2 l de PBS-T-EDTA con una concentración inicial de 0,005 % de Tween20 para elaborar una concentración final de Tween20 de 0,01 %. El chip sensor del modelo lineal general (GLM) se normalizó, se condicionó previamente y se activó con una mezcla equitativa de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC)/N-hidroxisulfosuccinimida (s-NHS) en la dirección horizontal durante 300 seg a una velocidad de flujo de 30 µl/min. La inmovilización se llevó luego a cabo con proteína recombinante A/G (Thermo Scientific) (60 µg/ml en 10 mM de acetato pH 4,5) en la dirección horizontal durante 300 seg a una velocidad de flujo de 30 µl/min que dio como resultado alrededor de 4370-4875 unidades de respuesta (RU) de proteína A/G en la superficie. El chip sensor se desactivó luego con etanolamina HCl 1 M en dirección horizontal durante 300 seg a una velocidad de flujo de 30 µl/min. El chip sensor se estabilizó con 18 seg de ácido fosfórico al 0,85 % a una velocidad de flujo de 100 µl/min 3 veces horizontalmente y 3 veces verticalmente.

[00329] Cada anticuerpo contra ANGPT2 se capturó en la superficie de la proteína A/G verticalmente durante 300 seg a una velocidad de flujo de 30 µl/min que dio como resultado un nivel de captura de alrededor de 2500 RU. El valor de referencia se estabilizó con la inyección de PBS-T-EDTA durante 60 seg a una velocidad de flujo de 100 µl/min horizontalmente con disociación de 120 seg. El analito (por ejemplo, HuANGPT2) se inyectó horizontalmente en el anticuerpo capturado durante 300 seg a una velocidad de flujo de 30 µl/min y una disociación de 1800 seg. Las concentraciones de los analitos fueron 0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM y 100 nM. La superficie se regeneró mediante la inyección de ácido fosfórico al 0,85 % durante 18 seg a una velocidad de flujo de 100 µl/min una vez horizontalmente y una vez verticalmente. Se inyectó PBS-T-EDTA durante 60 seg a una velocidad de flujo de 100 µl/min una vez verticalmente y una vez horizontalmente.

[00330] El área de interacción (interacciones con la superficie del sensor) y el blanco (PBS-T-EDTA con 0,01 % de Tween20 o 0 nM de analito (en la presente HuANGPT2)) se sustrajeron de los datos sin procesar. Luego, los sensogramas se ajustaron a fijación de Langmuir 1:1 para proporcionar valores de asociación (k_a), disociación (k_d) y

afinidad (K_D).

[00331] Los procedimientos anteriores se usaron para medir la afinidad de fijación a los siguientes analitos: ANGPT1 humana, ANGPT2 humana, ANGPT2 de *Macaca fascicularis*, ANGPT2 de conejo y ANGPT2 de rata. En el caso de los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención y el análogo de nesvacumab, no se observó fijación en ANGPT1 humana (K_D > 100 nM). Los resultados para la fijación a ANGPT2 humana y ANGPT2 de *Macaca fascicularis* se muestran en la Tabla 7.

[00332] Tabla 7. Propiedades de afinidad de fijación de los anticuerpos a ANGPT2 en modelos humanos y de *Macaca fascicularis*.

Anticuerpo	**k_a(1/Ms)**	**k_d (1/s)**	**K_D (nM)**	**k_a(1/Ms)**	**k_d (1/s)**	**kD (nM)**
	ANGPT2 humana			ANGPT2 de *Macaca fascicularis*		
CL_209881	1,51E+05	2,34E-05	0,155	1,64E+05	3,93E-05	0,240
ANGPT2-opt-1	1,44E+05	4,25E-05	0,294	1,52E+05	5,48E-05	0,360
ANGPT2-opt-2	1,25E+05	8,11E-05	0,649	1,35E+05	8,45E-05	0,626
ANGPT2-opt-13	1,32E+05	1,89E-05	0,144	1,42E+05	2,08E-05	0,146
ANGPT2-opt-19	8,18E+04	5,83E-05	0,712	8,77E+04	7,40E-05	0,844
ANGPT2-opt-31	1,25E+05	1,14E-05	0,091	1,35E+05	1,96E-05	0,145
Análogo de nesvacumab	1,48E+05	1,93E-05	0,130	1,51E+05	1,93E-05	0,128
Análogo de MEDI3617	6,14E+05	1,66E-02	27	NA	NA	NA
LC06	1,05E+05	1,25E-02	12	NA	NA	NA

NA = no disponible/no medido

[00333] Para los estudios que se llevaron a cabo en el modelo ANGPT2 de ratón, ANGPT2-opt-13 y el análogo de nesvacumab exhibieron valores K_D de 0,133 nM y 0,137 nM, respectivamente.

[00334] Para los estudios que se llevaron a cabo en el modelo de rata, los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención mostraron solamente una fijación débil (K_D ≥ 118 nM), mientras que el análogo de nesvacumab exhibió un valor K_D de 0,159 nM.

[00335] Los resultados muestran que los anticuerpos anti-ANGPT2 de la invención tienen alta afinidad para ANGPT2 humana y afinidad no medible para ANGPT1 humana.

[00336] Las siguientes divulgaciones contienen, entre otros, los siguientes ítems:

Forma de realización 1: Un anticuerpo anti-ANGPT2 o un fragmento de fijación al antígeno que comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (H-CDR3), y
una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3),
o
una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (H-CDR3); y
una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3),
o
una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (H-CDR3); y
una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3),
o
una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (H-CDR3); y
una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (L-CDR3),
o
una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (H-CDR3); y
una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (L-CDR3).

Forma de realización 2: El anticuerpo anti-ANGPT2 de la forma de realización 1,

en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8, respectivamente; SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 9, respectivamente; SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10, respectivamente; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 11, respectivamente; o SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 12, respectivamente,

Forma de realización 3: El anticuerpo anti-ANGPT2 de la forma de realización 2, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que tienen al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con respecto a las secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8, respectivamente; SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 9, respectivamente; SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10, respectivamente; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 11, respectivamente; o SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 12, respectivamente,

Forma de realización 4: El anticuerpo anti-ANGPT2 de la forma de realización 1, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena liviana que comprenden SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32, respectivamente; SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34, respectivamente; SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36; respectivamente; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38; respectivamente; o SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40.

Forma de realización 5: El anticuerpo anti-ANGPT2 de la forma de realización 4, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena liviana que tienen al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con respecto a las secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32, respectivamente; SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34, respectivamente; SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36; respectivamente; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38; respectivamente; o SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40.

Forma de realización 6: El anticuerpo anti-ANGTP2 o fragmento de fijación al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 5, en donde al anticuerpo anti-ANGTP2 o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a al menos un residuo de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, o a SEQ ID NO: 51.

Forma de realización 7: Un anticuerpo anti-ANGTP2 o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos del dominio FLD de ANGPT2 humana con SEQ ID NO: 51, o a SEQ ID NO: 51.

Forma de realización 8: Un anticuerpo anti-ANGTP2 o fragmento de fijación al antígeno de este que compite por la fijación a SEQ ID NO: 51 con un anticuerpo anti-

ANGTP2 de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 7.

Forma de realización 9: Un polinucleótido que tiene una secuencia que codifica un anticuerpo como se define en cualquiera de las formas de realización 1 a 8.

Forma de realización 10: Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la forma de realización 9.

Forma de realización 11: Una célula huésped transformada o transfectada con el polinucleótido de acuerdo con la forma de realización 9 o con el vector de acuerdo con la forma de realización 10.

Forma de realización 12: Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8, que comprende (a) cultivar una célula huésped de acuerdo con la forma de realización 11 en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8 y (b) recuperar el anticuerpo producido del cultivo.

Forma de realización 13: Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

Forma de realización 14: La composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización 13, en donde la composición también comprende un segundo agente terapéutico seleccionado.

Forma de realización 15: La composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización 13 o 14, en donde la composición se administra mediante una vía de administración parenteral, intravenosa o subcutánea.

Forma de realización 16: Un anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8 para usar como medicamento.

Forma de realización 17: Un método para tratar enfermedades o trastornos que pueden aliviarse mediante tratamiento con un anticuerpo anti-ANGPT2, en donde el método comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz desde el punto de vista farmacéutico del anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8.

Forma de realización 18: Un anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8 para usar en el tratamiento de enfermedades o trastornos que se pueden aliviar mediante tratamiento con un anticuerpo anti-ANGPT2.

Forma de realización 19: El uso del anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o trastornos que se pueden aliviar mediante tratamiento con un anticuerpo anti-ANGPT2.

Forma de realización 20: El método de la forma de realización 17, en donde el anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de la forma de realización 18, o el uso del anticuerpo anti-ANGPT2 o fragmento de fijación al antígeno de la forma de realización 19, en donde la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, infarto del miocardio, isquemia, lesión isquémica por revascularización, hipertensión por apoplejía, hipertensión arterial pulmonar, hipertensión arterial pulmonar idiopática, trastorno cerebral inducido por traumatismo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, esclerosis múltiple, hipertensión inducida por embarazo y preeclampsia, septicemia, septicemia grave, choque septicémico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis, enfermedad por cambios mínimos, glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS), síndrome nefrótico, enfermedad renal diabética (DKD), enfermedad renal crónica (CKD), insuficiencia renal diabética, enfermedad renal terminal, isquemia o lesión isquémica por revascularización, cáncer, carcinoma hepatocelular, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), enfisema, lesiones pulmonares agudas (ALI), síndrome de enfermedad respiratoria aguda (ARDS), síndrome respiratorio agudo grave (SARS), síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS), hiperpermeabilidad vascular (y trastornos asociados), lesión renal aguda, carcinoma de células renales, insuficiencia cardíaca, nefritis lúpica, fenómeno de Raynaud, pancreatitis, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardíaca congénita, virus del dengue, malaria, hantavirus, edema, regeneración, lupus, enfermedad pulmonar intersticial, escleroderma, retinopatías, nefropatía diabética, hipertensión portal, crecimiento de várices y trasplante de hígado.

Forma de realización 21: El método de la forma de realización 20, el anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de la forma de realización 20, o el uso del anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de la forma de realización 20, en donde la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo que consiste en enfermedad renal crónica, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y septicemia.

Forma de realización 22: El método de la forma de realización 17 o 20, que además comprende administrar un segundo agente terapéutico seleccionado.

Forma de realización 23: El método de la forma de realización 17 o 20, en donde dicho anticuerpo se administra mediante una vía de administración parenteral, intravenosa o subcutánea.

Forma de realización 24: Un método para bloquear la función de ANGPT2 humana en un paciente humano, que comprende administrar a dicho paciente humano una composición que comprende el anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8 en una cantidad suficiente para bloquear una respuesta mediada por ANGPT2 en dicho paciente humano.

Forma de realización 25: Un anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8 para usar en el bloqueo de la función de ANGPT2 humano.

Forma de realización 26: El uso del anticuerpo anti-ANGPT2 o el fragmento de fijación al antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8 en la elaboración de un medicamento para bloquear la función de ANGPT2 humana.

Forma de realización 27: Un polinucleótido aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena liviana, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada comprende cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 7, SEQ ID NO: 13 a 17; SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, o SEQ ID NO: 39; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8 a 12, SEQ ID NO: 19 a 26, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, o SEQ ID NO: 40.