



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 402 918**

⑮ Int. Cl.:

**C07K 5/00** (2006.01)  
**C07K 1/00** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2002 E 10075639 (4)**

⑰ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2316845**

④ Título: **Agentes de unión específicos de angiopoietina-2 humana**

⑩ Prioridad:

**11.10.2001 US 328624 P**  
**27.09.2002 US 414155 P**  
**10.10.2002 US 269695**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.05.2013**

⑬ Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)**  
**One Amgen Center Drive**  
**Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

⑭ Inventor/es:

**OLINER, JONATHAN DANIEL y**  
**MIN, HOSUNG**

⑮ Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 402 918 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Agentes de unión específicos de angiopoietina-2 humana

La presente solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes de patente provisional de los EE.UU. número de serie 60/328,624, presentada el 11 de octubre de 2001, la cual se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia.

**Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con agentes de unión específicos que reconocen y se unen a la angiopoietina-2 (Ang-2). Más específicamente, la invención se relaciona con la producción, el uso en diagnóstico y terapéutico de agentes de unión específicos y fragmentos de estos, que se unen específicamente a Ang-2.

**10 Antecedentes de la invención**

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

**15** Se conocen muchas enfermedades asociadas con la angiogénesis desregulada o indeseada. Dichas enfermedades incluyen, a modo no taxativo, la neovascularización ocular, como retinopatías (incluso retinopatía diabética), degeneración macular asociada con la edad, psoriasis, hemangioblastoma, hemangioma, arterioesclerosis, enfermedades inflamatorias como una enfermedad inflamatoria reumática o reumatoidea, especialmente artritis (incluso artritis reumatoidea) o trastornos inflamatorios crónicos como asma crónico, aterosclerosis arterial o post 20 trasplante, endometriosis y enfermedades neoplásicas, por ejemplo, los llamados tumores sólidos o líquidos (o hematopoiéticos) (como leucemias y linfomas). Otras enfermedades asociadas con Angiogénesis indeseada serán evidentes para los entendidos en la técnica.

**25** A pesar de que muchos sistemas de transducción de señales han estado implicados en la regulación de la angiogénesis, uno de los sistemas de selección de células endoteliales mejor caracterizados involucra la tirosina quinasa receptora Tie-2 (denominada "Tie-2" o "Tie-2R" (también denominada "ORK"); Tie-2 murina también se denomina "tek") y sus ligandos, las angiopoietinas (Gale, N. W. and Yancopoulos, G. D., Genes Dev. 13:1055-1066 [1999]). Hay 4 angiopoietinas conocidas: de angiopoietina1 ("Ang-1") a angiopoietina-4 ("Ang-4"). Estas angiopoietinas también se denominan "ligandos Tie-2". (Davis, S., et al, Cell, 87:1161-1169 [1996]; Grosios, K., et al, Cytogenet Cell Genet, 84:118-120 [1999]; Holash, J., et al, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1617-1625 [1999]; Koblizek, T. I., et al, Current Biology, 8:529-532 [1998]; Lin, P., et al, Proc Natl Acad Sci USA, 95:8829-8834 [1998]; Maisonpierre, P. C., et al, Science, 277:55-60 [1997]; Papa-petropoulos, A., et al, Lab Invest, 79:213-223 [1999]; Sato, T. N., et al, Nature, 375:70-74 [1998]; Shyu, K. G., et al, Circulation, 98:2081-2087 [1998]; Suri, C., et al, Cell, 87:1171-1180 [1996]; Suri, C., et al, Science, 282:468-471 [1998]; Valenzuela, D. M., et al, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96:1904-1909 [1999]; Witzenbichler, B., et al, J Biol Chem, 273:18514-18521 [1998]). Mientras que la unión de Ang-1 al Tie-2 estimula la fosforilación de receptores en células endoteliales cultivadas, se ha observado que Ang-2 agoniza y antagoniza la fosforilación del receptor de Tie-2 (Davis, S., et al, [1996], *supra*; Maisonpierre, P.C., et al, [1997], *supra*; Kim, I., J.H. Kim, et al, *Oncogene* 19 (39): 4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewska, K., P.C. Maisonpierre, et al, *Cardiovascular Research* 49(3): 659-70 (2001)).

**40** Los fenotipos de Tie-2 y Ang-1 noqueador de ratones son similares y sugieren que la fosforilación de Tie-2 estimulada por Ang-1 media el remodelado y la estabilización del desarrollo de vasos en el útero a través del mantenimiento de la adhesión celular con apoyo de células endoteliales (Dumont, D. J., et al, Genes & Development, 8:1897-1909 [1994]; Sato, T. N., et al, Nature, 376:70-74 [1995]; Suri, C., et al, [1996], *supra*). Se cree que la función de Ang-1 en la estabilización de los vasos se conserva en el adulto, donde se expresa en forma amplia y constitutiva (Hanahan, D., Science, 277:48-50 [1997]; Zagzag, D., et al, Experimental Neurology, 159:391-400 [1999]). Por el contrario, la expresión de Ang-2 está limitada principalmente a sitios de remodelado vascular, donde se considera que bloquea la función de Ang-1, induciendo así el estado de plasticidad vascular que conduce a la angiogénesis (Hanahan, D., [1997], *supra*; Holash, J., et al, Science, 284:1994-1998 [1999]; Maisonpierre, P. C., et al, [1997], *supra*).

**50** Varios estudios publicados aparentemente demostraron la expresión de Ang-2 selectiva para vasos en enfermedades asociadas con Angiogénesis. Estos trastornos patológicos incluyen, por ejemplo, psoriasis, degeneración macular y cáncer, (Bunone, G., et al, American Journal of Pathology, 155:1967-1976 [1999]; Etoh, T., et al, Cancer. Research, 61:2145-2153 [2001]; Hangai, M., et al, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1617-1625 [2001]; Holash, J., et al, [1999] *supra*; Kuroda, K., et al, Journal of Investigative Dermatology, 116:713-720 [2001]; Otani, A., et al, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40:1912-1920 [1999]; Stratmann, A., et al, American Journal of Pathology, 153:1459-1466 [1998]; Tanaka, S., et al, J Clin Invest, 103:34-345 [1999]; Yoshida, Y., et al, International Journal of Oncology, 15:1221-1225 [1999]; Yuan, K., et al, Journal of Periodontal Research, 35:165-171 [2000]; Zagzag, D., et al, [1999] *supra*). La mayoría de estos estudios se han enfocado en el cáncer,

5 donde muchos tipos de tumores tienen una expresión de Ang-2 vascular. A diferencia de su expresión en una angiogénesis patológica, la expresión de Ang-2 en tejidos normales es muy limitada (Maisonneuve, P. C., *et al*, [1997], *supra*; Mezquita, J., *et al*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 260:492-498 [1999]). En el adulto normal, los tres sitios principales de angiogénesis son el ovario, la placenta, y el útero. Se trata de los tejidos principales en los tejidos normales (es decir, no cancerosos) en donde se detectó ARNm de Ang-2.

10 Algunos estudios funcionales sugieren que Ang-2 puede estar involucrada en la angiogénesis tumoral. Ahmad *et al.* (Cancer Res., 61:1255-1259 [2001]) describen una sobreexpresión de Ang-2 y muestran que está supuestamente asociada con un aumento en el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto en ratones. Véase también Etoh *et al*, *supra*, and Tanaka *et al*, *supra*, donde se presenta información que asocia la sobre expresión de Ang-2 con hipervascularesidad de tumores. Sin embargo, por otro lado Yu *et al.* (Am. J. Path., 158:563-570 [2001]) presentan datos que muestran una sobre expresión de Ang-2 en el carcinoma de pulmón de Lewis y las células de cáncer mamario TA3 supuestamente prolongaron la supervivencia del ratón que recibió inyecciones de los transfectantes correspondientes.

15 En los últimos años, varias publicaciones han sugerido a Ang-1, Ang-2 y/o Tie-2 como un objetivo posible para la terapia contra el cáncer. Por ejemplo, las patentes de los EE.UU. nos. 6,166,185, 5,650,490, y 5,814,464 divultan el concepto de anticuerpos de ligando anti-Tie-2 y cuerpos receptores. Lin *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95:8829-8834 [1998]) inyectaron que expresa Tie-2 soluble adenovirus en ratones; la Tie-2 soluble supuestamente disminuyó el número y tamaño de los tumores que se desarrollaron en los ratones. En un estudio relacionado, Lin *et al* (J. Clin. Invest., 100:2072-2078 [1997]) inyectaron una forma soluble de Tie-2 a ratas; este compuesto redujo supuestamente el tamaño del tumor en ratas. Siemeister *et al.* (Cancer Res., 59:3185-3189 [1999]) generaron líneas celulares de melanoma humano que expresaban el dominio extracelular de Tie-2, se inyectaron estas líneas celulares en ratones desnudos y llegaron a la conclusión que Tie-2 soluble supuestamente resultó en una "inhibición significativa" del crecimiento tumoral y la angiogénesis tumoral. Ante esta información y dado que Ang-1 y Ang-2 se unen a Tie-2, no queda claro a partir de estos estudios si Ang-1, Ang-2 o Tie-2 serían un objetivo atractivo para la terapia contra el cáncer.

20 La fusión de algunos péptidos en una proteína plasmática estable como una región constante Ig para mejorar la vida media de estas moléculas se encuentra descrita en, por ejemplo, la patente PCT WO 00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000.

25 La fusión de una proteína o un fragmento de esta en una proteína plasmática estable como una región constante Ig para mejorar la vida media de estas moléculas se ha descrito en diversas ocasiones (Véase, por ejemplo, patente de los EE.UU. 5,480,981; Zheng *et al*, J. Immunol., 154:5590-5600,(1995); Fisher *et al*, N. Engl. J. Med., 334:1697-1702,(1996); Van Zee, K. *et al*, J. Immunol., 156:2221-2230, (1996); patente de los EE.UU. 5,808,029, otorgada el 15 de septiembre de 1998; Capon *et al*, Nature, 337:525-531, (1989); Harvill *et al*, Immunotech., 1:95-105, (1995); WO 97/23614, publicada el 3 de julio de 1997; PCT/US 97/23183, presentada el 11 de diciembre de 1997; Linsley, J. Exp. Med., 174:561-569, (1991); WO 95/21258, publicada el 10 de agosto de 1995).

30 Una terapia anti-Ang-2 efectiva podría beneficiar a una gran población de pacientes con cáncer porque la mayoría de los tumores sólidos requieren que la neovascularización crezca más de 1-2 milímetros de diámetro. Dicha terapia también podría tener una aplicación más amplia en otras enfermedades asociadas con Angiogénesis, como retinopatías, artritis y psoriasis.

35 40 Existe la necesidad no desarrollada de identificar nuevos agentes que reconozcan particularmente y se unan a Ang-2. Dichos agentes serían útiles para exámenes de diagnóstico e intervención terapéutica en estado de enfermedad que están asociados con la actividad de Ang-2.

45 Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes de unión específicos de Ang-2 que modulen la actividad de Ang-2. Dichos agentes de la presente invención toman la forma de pepticuerpos, es decir, péptidos fusionados con otras moléculas como un dominio Fc de un anticuerpo, donde la porción péptídica se une específicamente a Ang-2.

### Sumario de la invención

50 En una realización, la presente invención está dirigida a péptidos (también denominados polipéptidos en la presente) que se unen a Ang-2. También en una realización de la presente invención se incluyen variantes y derivados de dichos péptidos.

En otra realización, los péptidos y variantes y derivados de estos de la presente invención se adjuntan a vehículos.

55 En otra realización, los péptidos pueden fusionarse a dominios Fc, proporcionando así pepticuerpos. Opcionalmente, los pepticuerpos comprenden al menos un péptido de, por ejemplo, SEQ ID NO:5, o SEQ ID NO: 149 - SEQ ID NO: 157, así como sales fisiológicamente aceptables de estos.

55 En otra realización adicional, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los agentes de unión específicos y variantes y derivados de estos.

En otra realización, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los pepticuerpos.

En otra realización, la invención proporciona el uso de la unión específica en un procedimiento de disminución de un agente tumoral de la presente invención o en un procedimiento para inhibir la angiogénesis en un individuo o en un procedimiento para el tratamiento del cáncer en un individuo.

- 5 En otra realización, la invención se refiere a una composición de fórmula:

$$(X^1)_a-F^1-(X^2)_b$$

y multímeros de esta, donde:

$F^1$  es un vehículo;

$X^1$  y  $X^2$  se selecciona cada uno independientemente de

- 10  $-(L^1)_c-P^1;$

$$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2;$$

$$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3; \text{ y}$$

$$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3-(L^4)_f-P^4;$$

- 15 donde uno o más de  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$ , y  $P^4$  comprende cada uno independientemente un polipéptido de conformidad con la invención. Por ejemplo, en una realización preferida,  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$ , y  $P^4$  puede comprender cada uno independientemente un polipéptido de

SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 149 a SEQ ID NO: 157.

En otra realización, la composición tiene la fórmula:

$$X^1-F^1$$

- 20 o

$$F^1-X^2$$

y sales fisiológicamente aceptable de esta, donde  $X^1$ ,  $F^1$ , y  $X^2$  son como se define en la presente. En otra realización, la composición tiene la fórmula:

$$F^1-(L^1)_c-P^1$$

- 25 y sales fisiológicamente aceptables de esta, donde  $L^1$ ,  $F^1$ , y  $P^1$  son como se define en la presente. En otra realización, la composición tiene la fórmula:

$$F^1-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2$$

y sales fisiológicamente aceptable de esta, donde  $L^1$ ,  $F^1$ ,  $P^1$ ,  $P^2$ , y  $c$  y  $d$  son como se define en la presente. En otra realización, la composición tiene la fórmula:

- 30  $P^1-(L^1)_c-F^1-(L^2)_d-P^2$

y sales fisiológicamente aceptable de esta. En una realización preferida,  $F^1$  es un dominio Fc o un fragmento de este.

- 35 La invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 149 a SEQ ID NO: 157 inclusive, donde dicho polipéptido es capaz de unirse a Ang-2, y sales fisiológicamente aceptables de este. Las SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 149 a SEQ ID NO: 157 se indican a continuación.

Péptido	SEQ ID NO:	Secuencia
12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS
12-9-3	151	LQEWCSEGVEDPFTFGCEKQR
12-9-4	152	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK

Péptido	SEQ ID NO:	Secuencia
12-9-5	153	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD
12-9-6	154	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG
12-9-7	155	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM
12-9-C2	156	LQDYCEGVEDPFTFGCENQR
12-9-C1	157	LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR
12-9	5	FDYCEGVEDPFTFGCDNH

En otra realización, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica los agentes de unión específicos (que incluyen, a modo no taxativo, péptidos y/o pepticuerpos) de la invención, como se describe en la presente. Un entendido en la técnica apreciará que cuando se conoce la secuencia de aminoácidos, las secuencias nucleotídicas correspondientes pueden determinarse inmediatamente utilizando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Suzuki, D., *An Introduction to Genetic Analysis*, W.H. Freeman Pub. Co. (1986). Las secuencias nucleotídicas ejemplares que codifican péptidos de la invención se establecen a continuación. Un entendido en la técnica reconocerá que más de un codón puede codificarse para un aminoácido particular, y por lo tanto, la invención se relaciona con cualquier secuencia nucleotídica que codifica los péptidos y/o pepticuerpos de la invención.

5 D., *An Introduction to Genetic Analysis*, W.H. Freeman Pub. Co. (1986). Las secuencias nucleotídicas ejemplares que codifican péptidos de la invención se establecen a continuación. Un entendido en la técnica reconocerá que más de un codón puede codificarse para un aminoácido particular, y por lo tanto, la invención se relaciona con cualquier secuencia nucleotídica que codifica los péptidos y/o pepticuerpos de la invención.

12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT	ggttcgaataactgcgacggtatggaagaccggtcaccc ggttcgacaaacagacc (SEQ ID NO: 233)
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS	aaacttggaaatactgcgacggtatggaagaccggtcaccc agggttgcgacaaaccagg (SEQ ID NO: 234)
12-9-3	151	LQEWCEGVEDPFTFGCEKQR	ctgcaggaaatggtgcgaagggtgtgaagaccggtcaccc ggttcgaaaaacagcgt (SEQ ID NO: 235)
12-9-4	152	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK	gctcaggactactgcgaaggatggaagaccggtcaccc cggttgcgaaatgcagaaa (SEQ ID NO: 236)
12-9-5	153	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD	ctgcgtggactactgcgaaagggtttcaggaccggtcaccc ggttcgaaaaacctggac (SEQ ID NO: 237)
12-9-6	154	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG	caccaggaaatactgcgaaaggatggaagaccggtcaccc cggttgcgaaataccagg (SEQ ID NO: 238)
12-9-7	155	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM	atgcgtggactactgcgaaaggatggaagaccggtcaccc ggttcgacaaacagatg (SEQ ID NO: 239)
12-9-C2	156	LQDYCEGVEDPFTFGCENQR	ctgcaggactactgcgaaagggtttgaagaccggtcaccc ggttcgaaaaaccagg (SEQ ID NO: 240)
12-9-C1	157	LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR	ctgcaggactactgcgaaagggtttgaagaccggtcaccc ggttcgaaaaacagcgt (SEQ ID NO: 241)
12-9	5	FDYCEGVEDPFTFGCDNH	ttcgactactgcgaaagggtttgaagaccggtcaccc gtgataaccac (SEQ ID NO: 242)

En otra realización, la invención se relaciona con vectores de expresión que comprenden al menos un polinucleótido de la invención. En otra realización, la invención se relaciona con células receptoras que comprenden el vector de expresión. Se apreciará que las células receptoras pueden ser células procariotas (como células de *E. coli*) o células eucariotas.

10 En otra realización, la invención se relaciona con vectores de expresión que comprenden al menos un polinucleótido de la invención. En otra realización, la invención se relaciona con células receptoras que comprenden el vector de expresión. Se apreciará que las células receptoras pueden ser células procariotas (como células de *E. coli*) o células eucariotas.

La invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de una composición como se describe en la presente, en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 La invención también se relaciona con el uso de los polipéptidos o una composición en un mamífero, o con un procedimiento para modular la angiogénesis en un mamífero, o con un procedimiento para inhibir el crecimiento tumoral caracterizado por la angiogénesis indeseada en un mamífero, o con un procedimiento para el tratamiento del cáncer en un mamífero.

20 La invención también se relaciona con el uso de los polipéptidos o una composición en un procedimiento para tratar al menos uno de permeabilidad vascular o filtración de plasma en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o composición como se describe en la presente. La invención

se refiere también a un método para tratar al menos una enfermedad neovascular ocular, obesidad, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria, trastornos inflamatorios, aterosclerosis, endometriosis, enfermedad neoplásica, enfermedad ósea o soriasis en un mamífero.

- 5 Se describe el uso de los agentes de unión específicos de la invención para tratar un número de enfermedades 10 asociadas con Angiogénesis desregulada o indeseada. Dichas enfermedades incluyen, a modo no taxativo, la neovascularización ocular como, por ejemplo, retinopatías (que incluyen la retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con la edad), psoriasis, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedades inflamatorias, como enfermedades inflamatorias reumáticas o reumatoideas, específicamente artritis (que incluye la artritis reumatoidea) u otros trastornos inflamatorios crónicos, como el asma crónico, aterosclerosis arterial o post-15 trasplante, endometriosis y enfermedades neoplásicas, por ejemplo, los llamados tumores sólidos y tumores líquidos (como leucemias). Las enfermedades adicionales que pueden tratarse mediante la administración de los agentes de unión específicos serán evidentes para los entendidos en la técnica. Dichas enfermedades adicionales incluyen, a modo no taxativo, la obesidad, la permeabilidad vascular, la extravasación del plasma y los trastornos óseos, incluida la osteoporosis.
- 15 Otras realizaciones de la invención resultarán evidentes a partir de la divulgación proporcionada en la presente.

#### Breve descripción de las figuras

- La figura 1 representa un gráfico del volumen tumoral (eje y) en relación con el tiempo (eje x) en un ratón que tiene un tumor A-431 y es tratado con el pepticuerpo TN8-Con4-C<sub>1</sub> o con tampón fosfato salino (PBS). Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 20 La figura 2 representa un gráfico de la concentración de pepticuerpos (eje y) en relación con el tiempo posterior a la dosis (eje x) en un ratón salvaje tratado con una dosis de 50µg de pepticuerpo 2xCon4-C, L1-7-N o L1-21-N. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 25 La figura 3 representa un gráfico del volumen tumoral (eje y) en relación con el tiempo (eje x) en un ratón que tiene un tumor A431 y es tratado con un pepticuerpo 2xCon4-C o con tampón fosfato salino (PBS) o un pepticuerpo de control. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 30 La figura 4 representa un gráfico que representa un crecimiento in vitro de células A431 cultivadas tratadas con pepticuerpo Con4-C, pepticuerpo de control, o no tratadas. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 35 La figura 5 representa un gráfico del volumen tumoral (eje y) en relación con el tiempo (eje x) en células tumorales Colo205 tratadas con pepticuerpo Con4-C, pepticuerpo L1-7-N, pepticuerpo L1-21-N o pepticuerpo 2xCon4-C o con tampón fosfato salino (PBS), anticuerpo anti-Ang-2 (Ab536) o Fc. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 40 La figura 6 representa un gráfico del volumen tumoral (eje y) en relación con el tiempo (eje x) en ratones que tienen un tumor de xenoinjerto Colo205 y tratados con varias dosis de pepticuerpo 2xCon4-C, o con tampón fosfato salino (PBS) o Fc. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 45 La figura 7 representa un gráfico del volumen tumoral (eje y) en relación con el tiempo (eje x) en ratón que tiene un tumor de xenoinjerto Colo205 y tratados con un pepticuerpo 2xCon4-C, o con pepticuerpos de control. Además, la Figura 7 representa un gráfico del área coloreada CD31/área total del tumor para estos pepticuerpos. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 50 La figura 8 representa un gráfico del volumen tumoral (eje y) en relación con el tiempo (eje x) en ratones que tienen un tumor de xenoinjerto Colo205 y tratados con un pepticuerpo 2xCon4-C, o con un tampón fosfato salino (PBS) o con un pepticuerpo de control. Los detalles se describen en los Ejemplos. Este gráfico muestra que los pepticuerpos anti-Ang-2 son capaces de inhibir el crecimiento del tumor Colo205, independientemente del comienzo de la dosificación.
- 45 La figura 9 describe un resumen de los índices de respuesta completa (CR) obtenidos en un ratones hembras utilizando anticuerpo Ab 536 o con pepticuerpo 2xCon4-C, en los modelos de xenoinjerto A431 y Colo-205. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 55 La figura 10A describe un gráfico del volumen tumoral (eje y) en relación con el tiempo (eje x) en ratones que tienen un tumor de xenoinjerto Colo205 y tratados con un pepticuerpo 2xCon4-C, o una combinación de 2xCon4-C y taxotere, o con tampón fosfato salino (PBS), o con PBS más taxotere. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- 50 La figura 10B describe un gráfico del volumen tumoral (eje y) en relación con el tiempo (eje x) en ratones que tienen un tumor de xenoinjerto Colo205 y tratados con un pepticuerpo 2xCon4-C, de conformidad con la presente invención, o una combinación de 2xCon4-C y 5-FU, o con tampón fosfato salino (PBS), o con PBS más 5-FU. Los detalles se describen en los Ejemplos.
- La figura 11A representa un gráfico de los niveles de inflamación de la mano (AUC±CSE) en un modelo de artritis inducida por adyuvante en ratas tratadas con pepticuerpo 2xCon4-C o con tampón fosfato salino (PBS), o con

pepticuerpo control, o controles normales o de artritis. Los detalles se describen en los Ejemplos.

La figura 11B representa un gráfico de la densidad mineral de hueso de mano (DMO) en un modelo de artritis inducida por adyuvante en ratas tratadas con pepticuerpo 2xCon4-C o con tampón fosfato salino (PBS), o con pepticuerpo control, o controles normales o de artritis. Los detalles se describen en los Ejemplos.

5 La figura 11C representa un gráfico del cambio en el peso corporal en un modelo de artritis inducida por adyuvante en ratas tratadas con pepticuerpo 2xCon4-C o con tampón fosfato salino (PBS), o con pepticuerpo control, o controles normal o de artritis. Los detalles se describen en los Ejemplos.

10 La figura 12 muestra dos gráficos que representan la inhibición de la angiogénesis de córnea inducida por VEGF en ratas. El primer gráfico muestra el número de vasos sanguíneos medido en ratas tratadas con albúmina sérica bovina (BSA), VEGF más tampón fosfato salino (PBS) o VEGF más pepticuerpo Con4-C de la invención. El segundo gráfico muestra el área de vasos sanguíneos ( $\text{mm}^2$ ) en ratas tratadas con BSA, VEGF más tampón fosfato salino (PBS) o VEGF más pepticuerpo Con4-C. Los detalles se describen en los Ejemplos.

15 Las figuras 13A, 13B y 13C representan los datos de mapeo del epítopo (D. O. 370) para la Ang-2 humana de longitud completa (hAng-2), al extremo N de hAng-2 y al extremo C de hAng-2, respectivamente, para los pepticuerpos TN8- Con4-C, L1-7-N y 12-9-3-C así como para el pepticuerpo control, Tie2-Pc, C2B8 o 5B 12. Los detalles se describen en los Ejemplos.

15 La figura 14 representa la afinidad de unión ( $K_D$ ) del pepticuerpo 2xCon-4-C usando el ensayo Sapidyne KinExA. Los detalles se describen en los Ejemplos.

#### **Descripción detallada de la invención**

20 Los títulos de las secciones se utilizan a fines organizativos en la presente y no deben interpretarse como restrictivas del objeto descrito.

25 Las técnicas estándar pueden utilizarse para la molécula de ADN recombinante, proteína y producción de anticuerpos, así como también para el cultivo de tejido y la transformación celular. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación suelen producirse de conformidad con las indicaciones del fabricante o como suelen lograrse en la técnica utilizando procedimientos convencionales como aquellos establecidos en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989]), o como se describe en la presente. Salvo que se provean definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica o médica descritas en la presente son aquellas conocidas y generalmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar pueden utilizarse para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación y el suministro a y tratamiento de pacientes.

#### **Definiciones**

Los términos utilizados en la presente memoria descriptiva se definen de la siguiente manera, salvo que se determine lo contrario en instancias específicas.

35 El término "Ang-2" se refiere al polipéptido establecido en la figura 6 de la patente de los EE.UU. No 6,166,185 ("ligando-2 de Tie-2") o fragmentos de estos, así como a los polipéptidos relacionados que incluyen variantes alélicas, variantes de empalme, derivados, variantes de sustitución, supresión y/o de inserción, péptidos de fusión y polipéptidos y homólogos entre especies. El polipéptido Ang-2 puede o no incluir residuos terminales adicionales, por ejemplo, secuencias líder, secuencias de dirección, metionina amino terminal, residuos de metionina amino terminal, y lisina y/o secuencias de proteínas de etiqueta o de fusión, en función de la manera en la que se prepare.

40 El término "biológicamente activo" cuando se utiliza en relación con Ang-2 o un agente de unión específico de Ang-2 se refiere a un péptido o polipéptido que tiene al menos una actividad característica de Ang-2 o de un agente de unión específico de Ang-2. Un agente de unión específico de Ang-2 puede tener actividad agonista, antagonista, o neutralizante o bloqueante con respecto a al menos una actividad biológica de Ang-2.

45 El término "agente de unión específico" se refiere a una molécula, preferentemente una molécula proteinácea, que se vincula específicamente a Ang-2 y variantes y derivados de esta, como se define en la presente. Un agente de unión específico puede ser una proteína, un péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido o compuesto de peso molecular pequeño que se une preferentemente a Ang-2. El agente de unión específico de conformidad con la presente invención es un péptido o un pepticuerpo, así como fragmentos, variantes o derivados de este, bien solos o en combinación con otras secuencias de aminoácidos, proporcionadas por técnicas conocidas. Dichas técnicas incluyen, entre otras, escisión enzimática, escisión química, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes. Los agentes de unión específicos anti-Ang-2 de la presente invención son capaces de unirse a porciones de Ang-2 que modulan, por ejemplo inhiben o estimulan, la actividad biológica de Ang-2 y/u otras actividades asociadas con Ang-2.

50 El término "variantes," como se utiliza en la presente, incluye los péptidos y polipéptidos donde los residuos

aminoácidos se insertan, se eliminan de y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos natural (o al menos una conocida) para el agente de unión. Las variantes de la invención incluyen proteínas de fusión como se describe más adelante.

5 "Derivados" incluye los agentes de unión que se han modificado de manera química de alguna manera distinta a la de las variantes de inserción, eliminación o substitución.

10 "Especificamente se vincula a Ang-2" se refiere a la capacidad de un agente de unión específico (tal como un pepticuerpo o una porción de péptido del este) de la presente invención para reconocer y vincularse al polipéptido Ang-2 humano de longitud completa o de longitud parcial, maduro, o un ortólogo de este, de manera que su afinidad (como se determina, por ejemplo, mediante ensayos de ELISA de afinidad o BIAcore como se describe en la 15 presente) o su capacidad de neutralización (como se determina por ejemplo, mediante ensayos de ELISA de neutralización descritos en la presente, o ensayos similares) sea al menos 10 veces tan grande, pero opcionalmente 50 veces tan grande, 100, 250 o 500 veces mayor, o incluso al menos 1000 mayor como la capacidad de afinidad o neutralización de esta por cualquier otra angiopoietina u otro péptido o polipéptido, en la que la porción de péptido del pepticuerpo primero se funde en una porción de Fc humano para la evaluación en tal ensayo.

15 20 El término "epítopo" se refiere a la porción de cualquier molécula capaz de ser reconocida por, y vincularse a un agente de unión específico, por ejemplo, un pepticuerpo, en una o más de las regiones de enlace de antígeno del agente de unión. Los epítopos normalmente constan de grupos de superficie químicamente activos de moléculas, tales como, por ejemplo, aminoácidos o cadenas laterales de carbohidrato y tienen características estructurales tridimensionales, específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos, como se utilizan en la presente, pueden ser contiguos o no contiguos.

25 El término "epítopo de inhibición y/o neutralización" es un epítopo que, cuando se une mediante un agente de unión específico, como un pepticuerpo, da como resultado la pérdida (o al menos la disminución) de la actividad biológica de la molécula, célula u organismo que contiene tal epítopo, *in vivo*, *in vitro* o *in situ*. En el contexto de la presente invención, el epítopo de neutralización se localiza o está asociado con una región biológicamente activa de Ang-2. De manera alternativa, el término "epítopo de activación" es un epítopo que, cuando se une mediante un agente de unión específico de la invención, como un anticuerpo, da como resultado la activación, o al menos el mantenimiento, 30 de una conformación biológicamente activa, de Ang-2.

35 El término "fragmento de pepticuerpo" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de un pepticuerpo completo e intacto.

40 45 El término "de origen natural", cuando se usa junto con los materiales biológicos como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células receptoras y similares, se refiere a aquellos que se encuentran en la naturaleza y no están modificados por un ser humano.

50 El término "aislado", cuando se usa en relación con Ang-2 o con un agente de unión específico de Ang-2, se refiere a un compuesto que está libre de al menos un polipéptido o compuesto contaminante que se encuentra en su ambiente natural, y, preferentemente, sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido contaminante de mamífero que interferiría con su uso terapéutico o de diagnóstico.

55 60 El término "maduro", cuando se utiliza en relación con el pepticuerpo de Ang-2 o un fragmento de este, o con cualquier otro agente de unión específico proteináceo de Ang-2 se refiere a un péptido o un polipéptido que carece de una secuencia líder o de señal. Cuando un agente de unión de la invención se expresa, por ejemplo, en una célula receptora procariota, el péptido o polipéptido "maduro" también puede incluir residuos de aminoácidos adicionales (pero que todavía carecen de la secuencia líder), como una metionina amino terminal, o uno o más residuos de metionina y lisina. Un péptido o polipéptido producido de esta manera puede utilizarse con o sin estos residuos de aminoácidos adicionales que se han eliminado.

65 70 Los términos "cantidad efectiva" y "cantidad terapéuticamente efectiva" cuando se usan en relación a un agente de unión específico de Ang-2 se refiere a una cantidad de un agente de unión específico que es útil o necesaria para apoyar un cambio observable en el nivel de una o más actividades biológicas de Ang-2. El cambio puede ser un incremento o una disminución en el nivel de la actividad de Ang-2. Preferentemente, el cambio es una disminución en la actividad de Ang-2.

75 80 El término "pepticuerpo" se refiere a una molécula que comprende un dominio Fc de anticuerpo unido a al menos un péptido. La producción de pepticuerpos se describe, en general, en la publicación PCT WO 00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000.

85 El término "variantes," como se utiliza en la presente, incluye las moléculas, como péptidos o combinaciones de péptido-vehículo, como pepticuerpos de la presente invención, donde los residuos de aminoácidos se insertan en, se eliminan de y/o son sustituidas en la secuencia de aminoácidos para tales moléculas. Las variantes que tienen uno o más aminoácidos insertados incluyen proteínas de fusión como se describe más adelante.

"Derivados" incluye los péptidos y/o combinaciones de péptido-vehículo, como pepticuerpos, que se han modificado

químicamente de alguna manera distinta a la de las variantes de inserción, eliminación o substitución.

El término "fragmento" se refiere a un péptido o combinación de péptido-vehículo que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de tales péptidos y/o combinaciones de péptido-vehículo. Tal fragmento puede surgir, por ejemplo, a partir de un truncamiento en el terminal amino, un truncamiento en el terminal carboxi y/o una eliminación interna de un residuo de la secuencia de aminoácidos del péptido o combinación de péptido-vehículo. Los fragmentos se pueden producir a partir de un empalme de ARN alternativo o de la actividad proteasa *in vivo* o *in vitro*. Tales fragmentos también se pueden construir mediante procedimientos de síntesis química de péptidos o mediante la modificación de un polipéptido que codifica un péptido, una combinación de péptido-vehículo o una porción de Fc y/o porción de péptido de un peptícuero.

10 El término "Fc" se refiere a un tipo de vehículo de la presente invención y comprende la secuencia de un fragmento de unión no antigénico de un anticuerpo que se produce a partir de la digestión proteolítica de un anticuerpo entero, en forma monomérica o multimérica. La fuente del Fc en la presente invención es preferentemente Fc completamente humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren la IgG1 y la IgG2. Sin embargo también se incluyen en la presente moléculas de Fc que son parcialmente humanas o se han obtenido de especies no humanas. Los Fc están formados por polipéptidos monoméricos que pueden estar unidos en formas diméricas o multiméricas mediante una asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativas varía entre 1 y 4 en función de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido a disulfuro que se produce a partir de la digestión con papaína de una IgG [véase Ellison et al. (1982), *Nucl. Acids. Res.* 10: 4071-9]. El término Fc nativo, como se utiliza en la presente, es genérico para las formas monomérica, dimérica y multimérica.

El término "dominio Fc" abarca el Fc nativo y las moléculas y secuencias variantes de Fc como se han definido anteriormente. Al igual que con las variantes de Fc y Fc nativos, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, digeridas a partir de un anticuerpo completo o producidas por otros medios.

25 El término "multímero", como se aplica a los dominios Fc o moléculas que comprenden dominios Fc se refiere a moléculas que tienen dos o más cadenas de polipéptidos asociadas de manera covalente, no covalente, o mediante otras interacciones covalentes y no covalentes. Habitualmente, las moléculas de IgG forman dímeros; las de IgM, pentámeros; las de IgD, dímeros; y las de IgA, monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros. Los multímeros se 30 pueden formar mediante la explosión de la secuencia y la actividad resultante de la fuente de Ig nativa del Fc o mediante derivación (como se define más adelante) de tal Fc nativo.

El término "dímero", como se aplica a los dominios Fc o moléculas que comprenden dominios Fc, se refiere a moléculas que tienen dos o más cadenas de polipéptidos asociadas de manera covalente o no covalente.

35 El término "vehículo" se refiere a una molécula que evita la degradación y/o incrementa la vida media, reduce la toxicidad, reduce la inmunogenicidad o incrementa la actividad biológica de una proteína terapéutica. Los ejemplos de vehículos incluyen un dominio Fc, así como un polímero lineal (por ejemplo, polietilenoglicol (PEG), polilisina, dextrano, etc.); un polímero de cadena ramificada (Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. No 4,289,872 de Denkenwalter et al, otorgada el 15 de septiembre de 1981; la patente de los EE.UU. No 5,229,490 de Tam, otorgada el 20 julio de 1993; WO 9321259 de Frechet et al, publicada el 28 de octubre de 1993); un lípido, un grupo de colesterol (tal como un esteroide); un hidrato de carbono u oligosacárido; o cualquier proteína, polipéptido o péptido 40 natural o sintético, que se une a un receptor de rescate. Los vehículos se describen más adelante.

45 Los términos "derivación" y "derivado" o "derivado" comprenden procedimientos y compuestos resultantes respectivamente donde (1) el compuesto tiene una porción cíclica; por ejemplo, una reticulación entre residuos de cisteinilo dentro del compuesto; (2) el compuesto está reticulado o tiene un sitio de reticulación; por ejemplo, el compuesto tiene un residuo cisteinilo y, de esta manera, forma dímeros reticulados en cultivo o *in vivo*; (3) uno o más enlaces peptídico están reemplazados por un enlace no peptídico; (4) el terminal N se reemplaza por -NRR 1, NRC(O)R 1, -NRC(O)OR 1, -NRS(O)2R 1, -NHC(O)NHR, un grupo succinimida, o benciloxicarbonil-NH- sustituido o no sustituido, donde R y R1 y los sustituyentes de anillo son como se definen en la presente más adelante; (5) el terminal C se reemplaza por -C(O)R2 o -NR3R4 donde R2, R3 y R4 son como se definen más adelante; y (6) los compuestos donde las porciones de aminoácidos individuales se modifican mediante tratamiento con agentes 50 capaces de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. Los derivados se describen más adelante en la presente.

55 El término "péptido" se refiere a moléculas de aproximadamente 3 a aproximadamente 75 aminoácidos, preferentemente moléculas de aproximadamente 5 a 50, más preferentemente de 8 a 40, y aún más preferentemente de aproximadamente 10 a 25 aminoácidos. Los péptidos pueden ser secuencias de aminoácidos naturales o artificiales (es decir de origen no natural). Los ejemplos de péptidos se pueden generar mediante cualquier de los procedimientos establecidos en la presente, como aquellos incluidos en una genoteca de péptidos (por ejemplo, una genoteca de expresión en fagos), generados mediante síntesis química, derivados por digestión de proteínas o generados utilizando técnicas de ADN recombinante.

La expresión "farmacológicamente activo" significa que una sustancia así descrita tiene una actividad que afecta a un parámetro médico (por ejemplo, presión arterial, recuento de células sanguíneas, nivel de colesterol) o una enfermedad (por ejemplo, cáncer, trastornos autoinmunes, etc.)

5 Los términos "péptido antagonista" o "péptido inhibidor" se refieren a un péptido que bloquea o, de alguna forma interfiere, con la actividad biológica de la proteína asociada de interés, o tiene actividad biológica comparable con un antagonista o inhibidor conocido de la proteína de interés asociada. De este modo, el término "péptido antagonista de Ang-2" comprende los péptidos que pueden identificarse o derivarse por tener características antagonistas de Ang-2.

10 De manera adicional, las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de la presente invención también están comprendidas en la presente. Por "sales fisiológicamente aceptables" se pretende hacer referencia a cualquier sal que se conoce o se ha descubierto posteriormente que es farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos específicos son: acetato; trifluoroacetato; hidrohaluros, como hidrocloruro e hidrobromuro; sulfato; citrato; tartrato; glicolato; y oxalato, mesilato, y fosfato.

#### Pepticuerpos

15 Un aspecto de la presente invención se refiere al desarrollo de pepticuerpos de Ang-2. La interacción de un ligando de proteína con su receptor a menudo tiene lugar en una interfaz relativamente grande. Sin embargo, como se ha demostrado para la hormona de crecimiento humana y su receptor, solamente unos pocos residuos clave en la interfaz contribuyen a la mayoría de la energía vinculante. Clackson et al, *Science* 267: 383-6 (1995). La mayor parte del ligando de proteína solamente muestra los epítopos de unión en la correcta tipología o sirve para funciones no relacionadas con el enlace. Por lo tanto, las moléculas de "péptido" de longitud solamente (en general de 2 a 40 aminoácidos) se pueden unir a la proteína receptora de un ligando de proteína grande dado. Tales péptidos pueden imitar la bioactividad de los ligandos de proteína grande ("agonistas de péptido") o, mediante unión competitiva, inhiben la bioactividad del ligando de proteína grande ("antagonistas de péptido").

20 25 La tecnología de expresión en fagos ha surgido como un procedimiento potente en la identificación de tales agonistas y antagonistas de péptido. Véase, por ejemplo, Scott et al. *Science* 249: 386 (1990); Devlin et al, *Science* 249: 404 (1990); la patente de los EE.UU. No. 5,223,409, otorgada el 29 de junio de 1993; la patente de los EE.UU. No. 5,733,731, otorgada el 31 de marzo de 1998; la patente de los EE.UU. No. 5,498,530, otorgada el 12 de marzo de 1996; la patente de los EE.UU. No. 5,432,018, otorgada el 11 de Julio de 1995; la patente de los EE.UU. No 5,338,665, otorgada el 16 de agosto de 1994; la patente de los EE.UU. No. 5,922,545, otorgada el 13 de Julio de 1999; el documento WO 96/40987, publicado el 19 de diciembre de 1996; y el documento WO 98/15833, publicado el 16 de abril de 1998.

30 35 40 En las genotecas de expresión en fagos de péptidos, se pueden expresar secuencias de péptidos al azar mediante fusión con proteínas de recubrimiento de fago filamento. Los péptidos expresados pueden eluirse por afinidad contra un dominio extracelular inmovilizado por anticuerpo de un receptor, si se desea. El fago retenido se puede enriquecer mediante rondas sucesivas de purificación por afinidad y repropagación. Los mejores péptidos de unión se pueden secuenciar para identificar los residuos clave dentro de una o más familias de péptidos relacionadas estructuralmente. Véase, por ejemplo, Cwirla et al, *Science*, 276: 1696-9 (1997), en la que se identificaron dos familias distintas. Las secuencias de péptidos también pueden sugerir qué residuos se pueden reemplazar de un modo seguro mediante exploración de Alanina o mediante mutagénesis al nivel de ADN. Se pueden crear genotecas de mutagénesis y seleccionarse para optimizar adicionalmente la secuencia de los mejores enlazadores. Lowman, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 401-24 (1997).

45 También se puede utilizar el análisis estructural de la interacción proteína - proteína para sugerir los péptidos que imitan la actividad de unión de ligandos de proteínas grandes. En tal análisis, la estructura cristalina puede sugerir la identidad y orientación relativa de los residuos críticos del ligando de proteína grande, a partir de los cuales se puede diseñar un péptido. Véase, por ejemplo, Takasaki et al, *Nature Biotech* 15: 1266-70 (1997). Estos procedimientos analíticos también se pueden utilizar para investigar la interacción entre una proteína receptora y los péptidos seleccionados mediante expresión en fagos, que pueden sugerir además la modificación de los péptidos para incrementar la afinidad de unión.

50 55 Otros procedimientos compiten con la expresión en fagos en la investigación de péptidos. Una genoteca de péptido puede fusionarse con el terminal carboxilo del represor lac y expresarse en *E. coli*. Otro procedimiento basado en *E. coli* permite la expresión en la membrana exterior de las células mediante fusión con una lipoproteína asociada con peptidoglicano (PAL). En lo sucesivo en la presente, estos procedimientos y los procedimientos relacionados se denominan de manera conjunta "expresión en *E. coli*." En otro procedimiento, la traducción de ARN aleatorio se detiene antes de la liberación del ribosoma, lo que tiene como resultado una genoteca de polipéptidos con su ARN asociado todavía unido. En lo sucesivo en la presente, estos procedimientos y los procedimientos relacionados se denominan de manera conjunta "expresión en ribosoma". Otros procedimientos emplean el enlace químico de los péptidos al ANR. Véase, por ejemplo, Roberts and Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-303 (1997). En lo sucesivo en la presente, este procedimiento y los procedimientos relacionados se denominan de manera conjunta "detección selectiva de ARN-péptido". Se han desarrollado bibliotecas de péptidos derivados químicamente donde

los péptidos están inmovilizados sobre materiales no biológicos estables, como rodillos de polietileno o resinas permeables a disolventes. Otra biblioteca de péptidos derivados químicamente utiliza la fotolitografía para detectar péptidos inmovilizados sobre portaobjetos de cristal. Estos procedimientos y los procedimientos relacionados se denominan de manera conjunta "detección selectiva de péptidos químicos". La detección selectiva de péptidos químicos puede ser ventajosa en cuanto a que permite el uso de D-aminoácidos y otros análogos no naturales, así como de elementos no peptídicos. Tanto los procedimientos químicos como biológicos se reseñan en Wells y Lowman, Curr. Opin. Biotechnol., 3: 355-62 (1992).

Conceptualmente, se pueden descubrir miméticos peptídicos de cualquier proteína utilizando expresión en fagos y los demás procedimientos mencionados anteriormente. Estos procedimientos se han usado para el mapeo de epítopos, para la identificación de aminoácidos críticos en las interacciones proteína-proteína y como guías para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Véase, por ejemplo, Cortese et al, Curr. Opin. Biotech. 7: 616-21 (1996). Actualmente las bibliotecas de péptidos se utilizan con frecuencia en estudios inmunológicos, como el mapeo de epítopos. Véase, Kreeger, The Scientist 10(13):19-20(1996).

Los péptidos identificados mediante detección selectiva de genotecas de expresión en fagos se han considerado guías en el desarrollo de agentes terapéuticos en lugar de agentes terapéuticos en sí mismos. Como otras proteínas y péptidos, se eliminarían rápidamente *in vivo* mediante la filtración renal, por mecanismos de aclaramiento celular en el sistema reticuloendotelial o mediante degradación proteolítica [Francis, (anteriormente)]. Como resultado, actualmente la técnica utiliza péptidos para validar las dianas farmacológicas o como armazones para diseñar compuestos orgánicos que podrían no haberse identificado tan fácilmente o tan rápidamente mediante detección selectiva de genotecas químicas [Lowman, (anteriormente); Kay et al, (anteriormente)]. La técnica se beneficiaría de un procedimiento por el cual dichos péptidos podrían dar con mayor facilidad agentes terapéuticos contra la angiogénesis.

#### Estructura de los pepticuerpos

Los polipéptidos de conformidad con la presente invención pueden unirse a una molécula que previene la degradación y/o aumenta la vida media, reduce la toxicidad, la immunogenicidad o aumenta la actividad biológica de dicho péptido (en la presente denominada "vehículo") a través del terminal-N o terminal-C del péptido. Por lo tanto, las moléculas péptido-vehículo de la presente invención pueden describirse mediante las siguientes cinco formulas y multímeros de las mismas:

(X1)a- F1-(X2)b	(FÓRMULA I)
X <sub>1</sub> -F <sub>1</sub>	(FÓRMULA II)
F <sub>1</sub> -X <sub>2</sub>	(FÓRMULA III)
F1-(L1)c- P1	(FÓRMULA IV)
F1-(L1)c- P1-(L2)d-P2	(FÓRMULA V)

donde:

30 F1 es un vehículo (preferentemente un dominio Fc);

X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se seleccionan independientemente de -(L1)c-P1, -(L1)c-P1-(L2)d - P2 - (L1)c-P1-(L2)d-P2-(L3)e-P3, y -(L1)c- P1-(L2)d-P2-(L3)c- P3-(L4)f -P4

P1, P2, P3, y P4 son cada uno independientemente secuencias de péptidos farmacológicamente activos como se describe en la presente;

35 L1, L2, L3, y L4 son cada uno independientemente enlazadores; y

"a", "b", "c", "d", "e", y "f" son cada uno independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de "a" y "b" sea 1.

#### Péptidos

La presente invención contempla péptidos que se unen de forma selectiva o específica a Ang-2. Se puede utilizar cualquier número de dichos péptidos junto con la presente invención. En particular, la expresión en fagos es útil en la generación de péptidos para su uso en la presente invención, ya que se ha demostrado que la selección por afinidad en genotecas de péptidos aleatorios se puede usar para identificar los ligandos peptídicos para cualquier sitio de cualquier producto génico. Dedman et al, J. Biol. Chem. 268: 23025-30 (1993).

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos divulgados en la técnica. Para los aminoácidos se usan abreviaturas de una sola letra. La X en cualquier secuencia (y a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario en un caso concreto), significa que puede estar presente cualquiera de los 20 residuos aminoácidos naturales, o cualquier aminoácido de origen no natural (descritos más adelante como "Variantes"). Cualquiera de estos péptidos se pueden enlazar en tándem (es decir,

secuencialmente), con o sin enlazadores y en el cuadro se proporcionan ejemplos de enlace en tándem. Los enlazadores se indican en la lista como L y pueden ser cualquiera de los enlazadores que se indican en la presente. Las repeticiones y los enlazadores en tándem se muestran separados por barras a efectos de claridad. Cualquier péptido que contenga un residuo cisteinilo puede estar reticulado con otro péptido que contenga Cys, uno o ambos pueden estar unidos a un vehículo. Además, cualquier péptido que tenga más de un residuo Cys puede formar un enlace disulfuro intrapeptídico. Cualquiera de estos péptidos se puede derivar como se describe en la presente. Para los derivados donde el terminal carboxilo puede taparse con un grupo amino, el grupo amino de tapado es -NH<sub>2</sub>. Para los derivados donde los residuos aminoácidos están sustituidos por porciones que no son residuos aminoácidos, las sustituciones se indican con una S, que significa cualquiera de las porciones descritas en Bhatnagar et al. *Med Chem.* 39: 3814-9 (1996), y Cuthbertson et al, *J. Med. Chem.* 40: 2876-82, 1997), que se incorporan por referencia. Todos los péptidos están unidos mediante enlaces peptídicos, a menos que se indique lo contrario.

#### Vehículos

En una realización, la presente invención proporciona al menos un péptido para unirse a al menos un vehículo (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>) a través del terminal N, el terminal C o una cadena lateral de uno de los residuos aminoácidos de los péptidos. También se pueden usar múltiples vehículos, por ejemplo Fc en cada terminal o un Fc en un terminal y un grupo PEG en el otro terminal o una cadena lateral.

Un dominio Fc es un vehículo preferido. El dominio Fc puede estar fusionado al terminal N o C de los péptidos o en ambos terminales N y C.

Como se ha indicado anteriormente, se describen variantes de Fc. Un Fc nativo puede estar modificarse ampliamente para formar una variante de Fc, siempre que se mantenga el enlace con el receptor de rescate. Véase, por ejemplo, los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478. En dichas variantes de Fc, se pueden eliminar uno o más sitios de un Fc nativo que proporcione características estructurales o actividad funcional no requerida por las moléculas de fusión de la presente invención. Estos sitios se pueden eliminar, por ejemplo, sustituyendo o eliminando residuos, insertando residuos en el sitio o truncando porciones que contienen el sitio. Los residuos insertados o sustituidos pueden también ser aminoácidos alterados, como peptidomiméticos o D-aminoácidos. Las variantes de Fc pueden ser deseables por una serie de razones, varias de las cuales se describe a continuación. Los ejemplos de variantes de Fc incluyen las moléculas y las secuencias en donde:

1. Se eliminan los sitios implicados en la formación de enlaces disulfuro. Dicha eliminación puede evitar la reacción con otras proteínas que contienen cisteína presentes en la célula receptora utilizada para producir las moléculas de la invención. Para este fin, el segmento que contiene cisteína en el terminal N puede truncarse o los residuos de cisteína se pueden suprimir o sustituir con otros aminoácidos (por ejemplo, alanilo, serilo). Incluso cuando los residuos de cisteína se eliminan, los dominios Fc de una cadena pueden seguir formando un dominio Fc dimérico que se mantiene unido de forma no covalente.

2. Un Fc nativo se modifica para hacerlo más compatible con una célula receptora seleccionada. Por ejemplo, se puede eliminar la secuencia PA cerca del terminal N de un Fc nativo típico, que puede ser reconocido por una enzima digestiva en *E. coli*, como la prolina iminopeptidasa. También se puede añadir un residuo metionilo de terminal N, especialmente cuando la molécula se expresa de forma recombinante en una célula bacteriana, como *E. coli*.

3. Una porción del terminal N de un Fc nativo se elimina para prevenir la heterogeneidad de terminal N cuando se expresa en una célula receptora seleccionada. Para este fin, se puede suprimir cualquier de los primeros 20 residuos de aminoácidos en el terminal N, en particular los de las posiciones 1, 2, 3, 4 y 5.

4. Se eliminan uno o más sitios de glicosilación. Los residuos que normalmente están glicosilados (por ejemplo, asparagina) pueden conferir respuesta citolítica. Dichos residuos pueden suprimirse o sustituirse con residuos no glicosilados (por ejemplo, alanina).

5. Se eliminan los sitios implicados en la interacción con el complemento, como el sitio de enlace C1q. Por ejemplo, se puede suprimir o sustituir la secuencia EKK de la IgG1 humana. El reclutamiento del complemento puede no ser ventajoso para las moléculas de la presente invención y, por lo tanto, pueden evitarse con dicha variante de Fc.

6. Se eliminan los sitios que afectan la unión a los receptores de Fc diferentes de un receptor de rescate. Un Fc nativo puede tener sitios para la interacción con ciertas glóbulos blancos que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención y de ese modo pueden eliminarse.

7. Se eliminan el sitio ADCC. Los sitios ADCC son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Molec. Immunol.* 29 (5):633-9 (1992) respecto de los sitios ADCC en IgG1. Estos sitios no son necesarios para las moléculas de fusión de la presente invención y por lo tanto se pueden eliminar.

8. Cuando el Fc nativo deriva de un anticuerpo no humano, el Fc nativo puede humanizarse. Normalmente, para humanizar un Fc nativo, se sustituirán residuos seleccionados en el Fc nativo no humano por residuos que se encuentran normalmente en Fc nativo humano. Las técnicas para la humanización de anticuerpos son conocidas en la técnica.

5 Un vehículo alternativo sería una proteína, polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o molécula pequeña (por ejemplo, un compuesto peptidomimético) capaz de vincularse a un receptor de rescate. Por ejemplo, podría usarse como vehículo un polipéptido tal como se describe en la patente de los EE.UU. No 5,739,277, otorgada el 14 de abril de 1998 y concedida a Presta et al. También podrían seleccionarse péptidos mediante presentación en fagos para el enlace con el receptor de rescate FcRn. Tales compuestos de enlace al receptor de rescate también se incluyen dentro del significado de vehículo y se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Dichos vehículos deben seleccionarse de modo que tengan un aumento de la vida media (por ejemplo, evitando secuencias reconocidas por proteasas) y una reducción de la inmunogenicidad (por ejemplo, favoreciendo secuencias no inmunogénicas, como se determinan en la humanización de anticuerpos).

10 15 Como se ha indicado anteriormente, también se pueden usar vehículos poliméricos para F1 y F2. Actualmente se dispone de diversos medios para la unión de porciones químicas útiles como vehículos, véase, por ejemplo, la publicación internacional del tratado de cooperación en materia de patentes (PCT) n.º WO 96/11953, titulado N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods. Esta publicación PCT da a conocer, entre otras cosas, la unión selectiva de polímeros soluble en agua al terminal N de proteínas.

20 25 Un vehículo polimérico preferido es polietilenglicol (PEG). El grupo PEG puede ser de cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular medio del PEG oscilará, preferentemente, entre aproximadamente 2 kiloDalton (kDa) y aproximadamente 100 kDa, más preferentemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, más preferentemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 10 kDa. Los grupos PEG se unirán, generalmente, a los compuestos de la invención por medio de acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo en la porción PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, tiol o éster) para dar un grupo reactivo en el compuesto de la invención (por ejemplo, un grupo aldehído, amino o éster).

30 35 Una estrategia útil para la PEGilación de péptidos sintéticos consiste en combinar, a través de la formación de un enlace conjugado en una solución, un péptido y una porción de PEG, teniendo cada uno una funcionalidad especial que es mutuamente reactiva hacia el otro. Los péptidos pueden prepararse fácilmente con síntesis en fase sólida convencional tal como se conoce en la técnica. Los péptidos se activan previamente con un grupo funcional apropiado en un sitio específico. Los precursores se purifican y se caracterizan completamente antes de que reaccionen con la porción de PEG. El enlace del péptido con PEG tiene lugar usualmente en fase acuosa y puede supervisarse fácilmente mediante HPLC analítica en fase inversa. Los péptidos PEGilados pueden purificarse fácilmente mediante HPLC preparativa y caracterizarse por HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas mediante desorción por láser.

40 45 50 Los polímeros de polisacárido son otro tipo de polímero soluble en agua que pueden utilizarse para la modificación de proteínas. Los dextrans son polímeros de polisacárido compuestos por subunidades individuales de glucosa vinculadas principalmente mediante enlaces 1-6. El propio dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular y está disponible fácilmente en pesos moleculares desde aproximadamente 1 kDa hasta aproximadamente 70 kDa. El dextrano es un polímero soluble en agua adecuado para su uso en la presente invención como un vehículo por sí mismo o en combinación con otro vehículo (por ejemplo, Fc). Véase, por ejemplo, el documento WO 96/11953 y el documento WO 96/05309. Se ha notificado el uso de dextrano conjugado a inmunoglobulinas terapéuticas o de diagnóstico; véase, por ejemplo, la publicación de patente europea no 0 315 456. Se prefiere dextrano de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 20 kDa cuando se usa dextrano como vehículo según la presente invención.

#### 55 45 Enlazadores

Cualquier grupo "enlazador" es opcional. Cuando está presente, su estructura química no es crucial, ya que sirve principalmente como espaciador. El enlazador está constituido, preferentemente, por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Por lo tanto, el enlazador puede estar formado por entre 1 y 20 aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, donde los aminoácidos se seleccionan de los 20 aminoácidos que se producen de manera natural. Uno o más de estos aminoácidos pueden glicosilarse, como entienden los entendidos en la técnica. Los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. Un enlazador está constituido por una mayoría de aminoácidos que no están estéricamente impedidos, como glicina y alanina. Por lo tanto, los enlazadores preferidos son poliglicinas (particularmente (Gly)<sub>5</sub>, (Gly)<sub>8</sub>), poli(Gly-Ala), y polialaninas. Las combinaciones de Gly y Ala también son preferidas dado que es el enlazador denominado en la presente como K1 y tiene una secuencia de aminoácidos que se expone en los Ejemplos de la presente.

También son posibles los enlazadores no peptídicos. Por ejemplo, pueden utilizarse enlazadores de alquilo como -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-C(O)-, donde s = 2-20. Estos enlazadores de alquilo pueden sustituirse además por cualquier grupo de no impedimento estérico, como alquilo inferior (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH<sub>2</sub>, fenilo, etc. Un enlazador no peptídico ejemplificativo es un enlazador de PEG, y tiene un peso molecular de

100 kDa a 5000 kDa, preferentemente de 100 kDa a 500 kDa. Los enlazadores peptídicos pueden modificarse para formar derivados de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

#### Variantes y Derivados

5 Se describen las variantes y derivados de los agentes de unión específicos. Dentro de las variantes se incluyen variantes de inserción, de supresión y de sustitución. Se entiende que un agente de unión específico de la presente invención puede contener uno, dos o los tres tipos de variantes. Las variantes de inserción y de sustitución pueden contener aminoácidos naturales, aminoácidos no convencionales (como se expone más adelante) o ambas.

10 En un ejemplo, se proporcionan variantes de inserción donde uno o más residuos de aminoácidos, aminoácidos naturales o no convencionales, complementan una secuencia de aminoácidos peptídicos o de pepticuerpos. Las inserciones se pueden localizar en uno o en ambos terminales de la proteína o pueden encontrarse dentro de las 15 regiones internas de la secuencia de aminoácidos del pepticuerpo. Las variantes de inserción con residuos adicionales en uno o en ambos terminales pueden incluir, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcadores o etiquetas de aminoácidos. Las variantes de inserción incluyen péptidos y pepticuerpos donde uno o más residuos de aminoácidos se añaden a la secuencia de aminoácidos del péptido o el pepticuerpo, o fragmento de este.

20 Los productos variantes también incluyen péptidos y pepticuerpos maduros donde las secuencias líder o de señal se eliminan y las proteínas resultantes tienen residuos amino terminales adicionales, cuyos aminoácidos pueden ser naturales o no naturales. Se contemplan agentes de unión específicos (tales como pepticuerpos) con un residuo de metionilo adicional en la posición de aminoácido -1 (Met<sup>1</sup>-pepticuerpo), ya que son agentes de unión específicos con residuos de metionina y lisina adicionales en las posiciones -2 y -1 (Met<sup>2</sup>-Lys<sup>-1</sup>). Las variantes que tienen residuos Met, Met-Lys, Lys adicionales (o uno o más residuos básicos, en general) son particularmente útiles para una producción de proteínas recombinantes potenciada en células receptoras bacterianas.

25 También se describen variantes de agentes de unión específicos que tienen residuos de aminoácidos adicionales que surgen del uso de sistemas de expresión específicos. Por ejemplo, el uso de vectores comercialmente disponibles que expresan un polipéptido deseado como parte del producto de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) proporciona el polipéptido deseado que tiene un residuo de glicina adicional en la posición de aminoácido -1 después de la escisión del componente GST del polipéptido deseado. También se contemplan variantes que resultan de la expresión en otros sistemas de vector, incluidos aquellas donde se incorporan etiquetas de polihistidina en la secuencia de aminoácidos, generalmente en el terminal carboxi y/o amino de la secuencia.

30 Las variantes de inserción también incluyen proteínas de fusión donde los terminales amino y/o carboxi del péptido o pepticuerpo se fusionan con otro polipéptido, un fragmento de este o aminoácidos que no se reconocen generalmente como parte de cualquier secuencia de proteínas específica. Ejemplos de tales proteínas de fusión incluyen polipéptidos inmunógenos, proteínas con vidas medias en circulación prolongadas, como regiones constantes de inmunoglobulinas, proteínas marcadoras, proteínas o polipéptidos que facilitan la purificación del péptido o pepticuerpo deseado y secuencias de polipéptidos que estimulan la formación de proteínas multiméricas (tales como motivos de cremallera de leucina que son útiles en la formación/estabilidad de dímeros).

35 Este tipo de variante de inserción tiene, generalmente, toda o una parte sustancial de la molécula nativa, unida al terminal N o C, a toda o una parte de un segundo polipéptido. Por ejemplo, las proteínas de fusión emplean normalmente secuencias líder de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un receptor heterólogo. Otra proteína de fusión útil incluye la adición de un dominio inmunológicamente activo, como un epítopo de anticuerpo, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. La inclusión de un sitio de escisión en o 40 próximo a la unión de fusión facilitará la eliminación del polipéptido extraño tras la purificación. Otras fusiones útiles incluyen enlaces de dominios funcionales, como sitios activos de enzimas, dominios de glicosilación, señales dirigidas celulares o regiones transmembrana.

45 Existen diversos sistemas de expresión de proteínas de fusión comercialmente disponibles que pueden utilizarse. Los sistemas particularmente útiles incluyen, entre otros, el sistema de glutatión-S-transferasa (GST) (Pharmacia), el sistema de la proteína vinculante a maltosa (NEB, Beverley, MA), el sistema FLAG (IBI, New Haven, CT) y el sistema 6xHis (Qiagen, Chatsworth, CA). Estos sistemas pueden producir péptidos y/o pepticuerpos recombinantes que portan solo un número pequeño de aminoácidos adicionales, que probablemente no afecten en forma 50 significativa la actividad del péptido o pepticuerpo. Por ejemplo, tanto el sistema FLAG como el sistema 6xHis añaden sólo secuencias cortas, las cuales son poco antigenicas y que no afectan de manera adversa el plegamiento de un polipéptido a su conformación nativa. Otra fusión N terminal que se considera útil es la fusión de un dipéptido de Met-Lys en la región N-terminal de la proteína o los péptidos. Dicha fusión puede producir aumentos beneficiosos de la actividad o expresión proteica.

55 Otros sistemas de fusión producen híbridos de polipéptidos donde es deseable escindir la pareja de fusión del péptido o pepticuerpo deseado. En una realización, la pareja de fusión está unida al pepticuerpo recombinante mediante una secuencia peptídica que contiene una secuencia de reconocimiento específico para una proteasa. Los ejemplos de secuencias adecuadas son las reconocidas por la proteasa del virus del tabaco (Life

Technologies, Gaithersburg, MD) o el Factor Xa (New England Biolabs, Beverley, MA).

También se describen polipéptidos de fusión que comprenden el polipéptido de la presente invención, en combinación con el factor tisular truncado (tTF). El tTF es un agente dirigido vascular que consiste en una forma truncada de una proteína inductora de la coagulación humana que actúa como agente de coagulación de vasos sanguíneos tumorales, como se describe en las patentes de los EE.UU. Nos. 5,877,289; 6,004,555; 6,132,729; 6,132,730; 6,156,321; y la patente europea No. EP 0988056. La fusión de tTF en el pepticuerpo o péptido anti-Ang-2, o fragmentos de estos, facilita la liberación de anti-Ang-2 en las células diana.

En otro aspecto, se describen variantes de supresión donde uno o más residuos de aminoácidos en un péptido o pepticuerpo son eliminados. Las supresiones pueden producirse en uno o ambos terminales del pepticuerpo o a partir de la eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos del pepticuerpo. Las variantes de supresión incluyen, necesariamente, todos los fragmentos de un péptido o pepticuerpo.

En aún otro aspecto, se describen variantes de sustitución de péptidos y pepticuerpos. Las variantes de sustitución incluyen los péptidos y pepticuerpos donde se eliminan uno o más residuos de aminoácidos y se sustituyen por uno o más aminoácidos alternativos, que pueden ser aminoácidos naturales o no naturales. Las variantes de sustitución generan péptidos y pepticuerpos que son similares al péptido y pepticuerpo original en cuanto a que las dos moléculas tienen un cierto porcentaje de aminoácidos que son idénticos. Las variantes de sustitución incluyen sustituciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 aminoácidos dentro de un péptido o pepticuerpo, donde el número de sustituciones puede ser de hasta un 10% o más de los aminoácidos del péptido o pepticuerpo. En un aspecto, las sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora, no obstante, la invención abarca sustituciones que son también no conservadoras y también incluye aminoácidos no convencionales.

La identidad y similitud de los péptidos y pepticuerpos relacionados se pueden calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Tales procedimientos incluyen, a modo no taxativo, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. ed., Oxford University Press, New York, (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo et al, SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Los procedimientos preferidos para determinar la relación o la identidad en porcentaje de dos péptidos o polipéptidos, o un polipéptido y un péptido, se diseñan para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a ensayo. Los procedimientos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles para el público. Los procedimientos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, a modo no taxativo, el paquete del programa GCG, que incluye GAP (Devereux, J., et al, Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul et al, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al, NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al, supra (1990)). También se puede usar el algoritmo de SmithWaterman para determinar la identidad.

Ciertos esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado la coincidencia de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta región pequeña alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta incluso si no existe una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el procedimiento de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos 10% de la longitud completa del polipéptido diana que se compara, es decir, al menos 40 aminoácidos contiguos donde se comparan secuencias de al menos 400 aminoácidos, 30 aminoácidos contiguos donde se comparan secuencias de al menos 300 a aproximadamente 400 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos contiguos donde se comparan secuencias de 200 a aproximadamente 300 aminoácidos, y al menos 10 aminoácidos contiguos donde se comparan secuencias de aproximadamente 100 a 200 aminoácidos.

Por ejemplo, utilizando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos para los cuales se ha de determinar el porcentaje de identidad de secuencia se alinean para obtener la coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos (el tramo coincidente, como se determina mediante el algoritmo). En algunas realizaciones, se utiliza, junto con el algoritmo, una penalización por apertura de huecos (que se calcula normalmente como la diagonal promedio 3X; la diagonal promedio es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que está usándose; la diagonal es la puntuación o número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácido mediante la matriz de comparación concreta) y una penalización por extensión de huecos (que es normalmente 1/10 veces la penalización de apertura de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62. En algunas realizaciones, también el algoritmo utiliza una matriz de comparación convencional (véase Dayhoff et al, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3)(1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:1091510919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).

En algunas realizaciones, los parámetros para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes:

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

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

Penalización por hueco: 12

5 Penalización de longitud de hueco: 4

Umbral de similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En ciertas realizaciones, los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto con la ausencia de penalización por huecos finales) utilizando el algoritmo GAP.

10 En algunas realizaciones, los parámetros para secuencias de moléculas de polinucleótidos (a diferencia de una secuencia de aminoácidos) incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman et al, supra (1970);

Matriz de comparación: coincidencias = + 10, desfase = 0

Penalización por hueco: 50

15 Penalización de longitud de hueco: 3

El programa GAP también puede ser útil con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones de moléculas de polinucleótidos.

20 Pueden utilizarse otros ejemplos de algoritmos, penalizaciones de apertura de huecos, penalizaciones de extensión de huecos, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc., incluidos los expuestos en el Manual de Programas, Paquete de Wisconsin, Versión 9, septiembre de 1997. Las selecciones concretas que han de realizarse serán evidentes para los entendidos en la técnica y dependerán de la comparación específica que ha de hacerse, como ADN a ADN, proteína a proteína, proteína a ADN; y adicionalmente, si la comparación es entre pares de secuencias dados (en cuyo caso se prefieren generalmente GAP o BestFit) o entre una secuencia y una base de datos de secuencias amplia (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).

25 Como se utiliza en la presente, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2<sup>a</sup> Edición, E.S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991 )), que se incorpora en la presente a modo de referencia.

30 Los aminoácidos pueden tener estereoquímica L o D (a excepción de Gly, que no es ni L ni D) y los polipéptidos y las composiciones de la presente invención pueden comprender una combinación de estereoquímicas. Sin embargo, se prefiere la estereoquímica L. La invención también proporciona moléculas inversas donde la secuencia desde amino terminal a carboxi terminal de los aminoácidos está invertida. Por ejemplo, la inversa de una molécula que tiene la secuencia normal X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub> sería X<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>. La invención también proporciona moléculas retro-inversas, donde, como se indicó anteriormente, la secuencia desde amino terminal a carboxi terminal de los aminoácidos está invertida y los residuos que normalmente son enantiómeros L se alteran en estereoisómero D.

35 Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales como aminoácidos  $\alpha$ , aminoácidos  $\alpha$ -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen, a modo no taxativo: ácido aminoacético, beta-alanina, ácido betaminoacético, ácido aminobutírico, ácido piperídico, ácido aminocapriico, ácido aminoheptanoico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, N-etylglicina, N-etylaspargina, hidroxilisina, halo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, alosoleucina, N-metylglicina, sarcosina, N-metilsoleucina, N-metylvalina, norvalina, norleucina, oritina, 4-hidroxiprolina, -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetilisina,  $\epsilon$ -N-acetilisiba, O-fosferina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina,  $\sigma$ -N-metilarginina y otros aminoácidos similares y aminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina).

45 De forma similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos monocatenarias es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de los transcriptos de ARN naciente se denomina dirección de transcripción; las regiones de la secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y son 5' al extremo 5' del transcripto de ARN se denominan "secuencias corriente arriba"; las regiones de la secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 3' al extremo 3' del transcripto de ARN se denominan "secuencias corriente abajo".

Se apreciará que los residuos de aminoácidos pueden dividirse en clases basándose en sus propiedades de cadena lateral comunes:

1. Hidrófobos neutros: Alanina (Ala; A), Valina (Val; V), Leucina (Leu; L), Isoleucina (Ile; I), Prolina (Pro; P), Triptófano (Trp; W), Fenilalanina (Phe; F) y Metionina (Met, M).
- 5 2. Polares neutros: Glicina (Gly; G); Serina (Ser; S), Treonina (Thr; T), Tirosina (Tyr; Y), Cisteína (Cys; C), Glutamina (Glu; Q), Asparagina (Asn; N), y Norleucina.
3. Ácidos: Ácido aspártico (Asp; D), ácido glutámico (Glu; E);
4. Básicos: Lisina (Lys; K), Arginina (Arg; R), Histidina (His; H).

Véase Lewin, B., Genes V, Oxford University Press (1994), p.11.

- 10 Las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden abarcar residuos de aminoácidos no convencionales, que normalmente se incorporan mediante síntesis peptídica química en lugar de síntesis en sistemas biológicos. Estas incluyen, a modo no taxativo, peptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de porciones de aminoácidos. Las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase.
- 15 Al realizar dichas sustituciones de conformidad con algunas realizaciones, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobia y características de carga. Estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); Alanina (+1,8); glicina (0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

20 En la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos a la hora de conferir la función biológica interactiva sobre una proteína (Kyte et al, J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982)). Se sabe que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y siguen conservando una actividad biológica similar. Al realizar cambios en base al índice hidropático, en algunas realizaciones se puede incluir la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están en  $\pm 2$ . En algunas realizaciones, se pueden incluir los que están en  $\pm 1$  y en otras realizaciones se pueden incluir los que están en  $\pm 0,5$ .

25 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar de forma eficaz sobre la base de la hidrofilia, particularmente cuando el peptidujo o péptido biológicamente funcional creado de este modo está destinado al uso en realizaciones inmunológicas, como en este caso. En ciertas realizaciones, la hidrofilia media local mayor de una proteína está dirigida por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir con una propiedad biológica de la proteína.

30 A los siguientes residuos de aminoácidos se han asignado los valores de hidrofilia que se indican a continuación: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm 1$ ); glutamato (+3,0  $\pm 1$ ); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5  $\pm 1$ ); Alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al realizar cambios en base a una hidrofilia similar, en algunas realizaciones se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia pueden estar en  $\pm 2$ , en  $\pm 1$  y en algunas realizaciones, se pueden incluir los que están en  $\pm 0,5$ . También se pueden identificar epítopos de secuencias primarias de aminoácidos sobre la base de la hidrofilia. Estas regiones 40 también se denominan regiones centrales "epítópicas".

Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos se exponen en el cuadro 2 siguiente:

Tabla 2

Sustituciones de aminoácidos		
Residuos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, Glu, Asp	Gln
Asp	Glu, Gln, Asp	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser

<u>Sustituciones de aminoácidos</u>		
Residuos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Gln	Asn, Glu, Asp	Asn
Glu	Asp, Gln, Asn	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Thr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Thr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Un entendido en la técnica podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido, como se expone en la presente, utilizando técnicas bien conocidas. Un entendido en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la molécula que se pueden cambiar sin destruir la actividad dirigiendo a regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. En algunas realizaciones, se pueden identificar residuos o porciones de las moléculas que se conservan

5 entre péptidos o polipéptidos similares. En algunas realizaciones, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a sustituciones conservadoras de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar de forma adversa la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, un entendido en la técnica puede revisar los estudios de estructura-función identificando residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de esta comparación, se 10 puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a los residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. Un entendido en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos residuos de aminoácidos importantes previstos.

15 Un entendido en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con dicha estructura en polipéptidos similares. En vista de dicha información, un entendido en la técnica puede predecir la alineación de residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En algunas realizaciones, el entendido en la técnica puede elegir no realizar cambios radicales en los residuos de aminoácidos que han de estar sobre la superficie de la proteína, ya que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un entendido en la técnica puede generar

20 variantes de ensayo que contienen una sola sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes se pueden posteriormente seleccionar utilizando ensayos de actividad conocidos por los entendidos en la técnica. Tales variantes se pueden utilizar para reunir información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular dio como resultado una actividad destruida, reducida en forma indeseada o en una actividad inadecuada, las variantes con tal cambio pueden evitarse. En otras 25 palabras, basándose en la información reunida a partir de tales experimentos de rutina, un entendido en la técnica puede fácilmente determinar los aminoácidos donde se deben evitar las sustituciones, solas o en combinación con otras mutaciones.

Se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou et al, Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chou et al, Biochemistry, 30 113(2):211-222 (1974); Chou et al, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou et al, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 y Chou et al, Biophys. J., 26:367-384 (1979). Además, actualmente se dispone programas informáticos para ayudar a la predicción de la estructura secundaria. Un procedimiento de predicción de la estructura secundaria se basa en el modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia de más del 30%, o similitud mayor que el 40% suelen tener topologías estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructural de la proteína (PDB) ha proporcionado una mejor

predicción de la estructura secundaria, incluido el número potencial de plegamientos dentro de una estructura de los polipéptidos o proteínas. Véase Holm et al, Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner et al, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3): 369 - 376 (1997)) que existe un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dados y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural llegará a ser notablemente más precisa.

Los procedimientos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen el "enhebrado" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl et al, Structure, 4(1):15-19 (1996)), el "análisis del perfil" (Bowie et al, Science, 253:164-170 (1991); Gribskov et al, Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskov et al, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358 (1987)), y el "enlace de evolución" (véase Holm, ant. (1999) y Brenner, ant. (1997)).

10 Las variantes de pepticuerpo incluyen variantes de glicosilación donde uno o más de sitios de glicosilación, como un sitio de glicosilación unido a N, se ha añadido al pepticuerpo. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución o adición de residuos de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona un sitio nuevo potencial para la adición de una cadena de hidrato de carbono enlazada a N. En forma alternativa, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de hidrato de carbono enlazada a N existente. También se proporciona una reorganización de cadenas de hidratos de carbono enlazadas a N, donde se eliminan uno o más sitios de glicosilación unidos a N (normalmente aquellos que se producen de manera natural) y se crean uno o más sitios nuevos unidos a N.

20 La invención también describe "derivados", que incluyen pepticuerpos portadores de modificaciones diferentes de, o adicionales de inserciones, supresiones o sustituciones de residuos de aminoácidos. Preferentemente, las modificaciones son de naturaleza covalentes e incluyen, por ejemplo, el enlace químico con polímeros, lípidos, y otras porciones orgánicas e inorgánicas. Los derivados se pueden preparar para aumentar la vida media de circulación de un pepticuerpo, o se pueden diseñar para mejorar la capacidad de dirección para el pepticuerpo a las células, tejidos u órganos deseados.

25 Los derivados ejemplares incluyen porciones donde se han realizado una o más de las siguientes modificaciones:

- Uno o más de los enlaces peptídico  $[-C(O)NR-]$  (uniones) se han reemplazado por un enlace no peptídico tal como un enlace  $-CH_2$ -carbamato  $[-CH_2-OC(O)NR-]$ ; un enlace fosfonato; un enlace  $-CH_2$ -sulfonamida  $[-CH_2-S(O)NR-]$ ; un enlace urea  $[-NHC(O)NH-]$ ; un enlace  $-CH_2$ -amina secundaria; o un enlace peptidil alquilado  $[-C(O)NR^6-]$  donde  $R^6$  es alquilo inferior;

30 • Péptidos donde el terminal N se deriva en un grupo  $-NRR^1$ ; en un grupo  $-NRC(O)R$ ; en un grupo  $-NRC(O)OR$ ; en un grupo  $-NRS(O)_2R$ ; en un grupo  $-NHC(O)NHR$ , donde R y  $R^1$  son hidrógeno o alquilo inferior, con la condición de que R y  $R^1$  no sean ambos hidrógeno; en un grupo succinimida; en un grupo benciloxicarbonil-NH-(CBZ-NH-); o en un grupo benciloxicarbonil-NH- que tiene entre 1 y 3 sustituyentes sobre el anillo fenilo seleccionado entre el grupo constituido por alquilo inferior, alcoxi inferior, cloro, y bromo; y

35 • Péptidos donde el terminal C libre se deriva en  $-C(O)R^2$  donde  $R^2$  se selecciona entre el grupo constituido por alcoxi inferior y-  $NR^3R^4$  donde  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por hidrógeno y alquilo inferior. Por inferior se entiende un grupo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

40 De manera adicional, se pueden introducir modificaciones de aminoácidos individuales en los polipéptidos o composiciones de la invención haciendo reaccionar los residuos de aminoácidos dirigidos del péptido con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. A continuación se presentan ejemplos:

45 Los residuos de lisinilo y residuos amino terminales pueden reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otro ácido carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pantanodiona; y la reacción con gioxilato catalizada por transaminasa.

50 Los residuos de arginilo pueden modificarse mediante la reacción con uno o varios reactivos convencionales, incluidos fenilgioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la alta pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo guanidino de arginina.

55 Se ha estudiado extensamente la modificación específica de residuos de tiroxilo, con particular interés en la introducción de etiquetas espectrales en residuos de tiroxilo mediante la reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más habitualmente se pueden usar N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies O-acetil-tiroxilo y derivados 3-nitro, respectivamente.

55 Los grupos carboxilo de cadena lateral (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse de forma selectiva mediante la reacción con carbodiimidas ( $R'-N=C=N-R'$ ) como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etyl)carbodiimida o 1-etyl-3-(4-azonia-

4,4dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo pueden convertirse en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

Los residuos de glutaminilo y asparaginilo con frecuencia se desamidan para proporcionar los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo. Como alternativa, estos residuos se pueden desamidar en condiciones ácidas moderadas. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

La derivación con agentes bifuncionales es útil para reticular los péptidos o sus derivados funcionales a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros vehículos macromoleculares. Los agentes de reticulación de uso habitual incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluidos ésteres disuccinimidílicos como 3,3'-ditiobis(succinimidopropionato) y maleimidas bifuncionales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivantes como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato proporcionan compuestos intermedios fotoactivables que pueden formar reticulaciones en presencia de luz. En forma alternativa, se pueden emplear matrices insolubles en agua reactivas, como hidratos de carbono activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de los EE.UU. Nos. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; y 4,330,440 para la inmovilización de proteínas.

Otras modificaciones posibles incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, oxidación del átomo de azufre en Cys, metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina (Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de la amina del terminal N y, en algunos casos, amidación de los grupos carboxilo C-terminal.

Dichas porciones derivadas preferentemente mejoran una o más características, incluidos la actividad antiangiogénica, la solubilidad, absorción, vida media biológica y similares de los compuestos. En forma alternativa, las porciones derivadas pueden dar como resultado compuestos que tienen las mismas, o esencialmente las mismas, características y/o propiedades del compuesto que no está derivado. Las porciones pueden, en forma alternativa, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable del compuesto y similares.

Los compuestos también se pueden cambiar a nivel del ADN. La secuencia de ADN de cualquier parte del compuesto puede cambiarse a codones más compatibles con la célula receptora elegida. Para *E. coli*, que es la célula receptora preferida, se conocen en la técnica codones optimizados. Los codones pueden sustituirse para eliminar sitios de restricción o para incluir sitios de restricción silenciosos, que pueden ayudar al procesamiento del ADN en la célula receptora seleccionada. Las secuencias del vehículo, el enlazador y el ADN peptídico se pueden modificar para que incluyan cualquier de los anteriores cambios en la secuencia. Por lo tanto, todas las modificaciones, sustituciones, derivaciones, etc. descritas en la presente se aplican igualmente a todos los aspectos de la presente invención, incluidos, entre otros, péptidos, dímeros y multímeros de péptido, enlazadores y vehículos.

Adicionalmente, un entendido en la técnica puede examinar estudios de estructura-función identificando residuos en péptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. Habida cuenta de esta comparación, se puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en un péptido que corresponden a los residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o la estructura en péptidos similares. Un entendido en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos residuos de aminoácidos importantes previstos de los péptidos.

Un entendido en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con dicha estructura en polipéptidos similares. Con dicha información, un entendido en la técnica puede predecir la alineación de residuos de aminoácidos de un péptido con respecto a su estructura tridimensional. Un entendido en la técnica puede optar por no realizar cambios radicales en los residuos de aminoácidos que han de estar sobre la superficie de la proteína, ya que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un entendido en la técnica puede generar variantes de ensayo que contienen una sola sustitución de aminoácidos en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes se pueden posteriormente seleccionar usando ensayos de actividad conocidos por los entendidos en la técnica. Tales datos se pueden utilizar para recolectar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular dio como resultado una actividad destruida, reducida de manera indeseada o una actividad inadecuada, las variantes con tal cambio se podrían evitar. En otras palabras, en base a la información obtenida a partir de tales experimentos de rutina, un entendido en la técnica puede fácilmente determinar los aminoácidos donde se deben evitar las sustituciones, solas o en combinación con otras mutaciones.

Se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moult J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4): 422-427 (1996), Chou et al, *Biochemistry*, 13(2): 222-245 (1974), Chou et al, *Biochemistry*, 113(2): 211-222 (1974); Chou et al, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978), Chou et al, *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276 y Chou et al, *Biophys. J.*, 26: 367-384 (1979). Además, actualmente se dispone programas informáticos para ayudar a la predicción de la estructura secundaria. Un procedimiento de predicción de la estructura secundaria se basa en el modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia de más de un 30%, o similitud mayor que un 40% a menudo tienen topologías

estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructural de la proteína (PDB) ha proporcionado una mejor predicción de la estructura secundaria, incluido el número potencial de plegamientos dentro de una estructura de los polipéptidos o proteínas. Véase Holm et al, Nucl. Acid. Res., 27(1): 244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner et al, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3) 369-376 (1997): que existe un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dados y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural llegará a ser notablemente más precisa.

5 Los procedimientos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen el "enhebrado" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl et al, Structure, 4(1):15-9 (1996)), "análisis del perfil" (Bowie et al, Science, 253: 164-170 (1991); Gribskov et al, Meth. Enzym., 183: 146-159 (1990); Gribskov et al, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13): 4355-8 (1987)), y "enlace en evolución" (véase Home, ant., y Brenner, supra.).

10 Se describen agentes de unión específicos derivados, por ejemplo, pepticuerpos, modificados de manera covalente para incluir una o más uniones de polímeros solubles en agua como polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol, como describen las patentes de los EE.UU. Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; y 4,179,337. Otros polímeros útiles conocidos en la técnica incluyen monometoxipolietilenglicol, dextrano, 15 celulosa, u otros polímeros basados en hidratos de carbono, poli-(N-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico, así como las mezclas de estos polímeros. Se prefieren, particularmente, los pepticuerpos modificados de manera covalente con subunidades de polietilenglicol (PEG). Los polímeros solubles en agua se pueden enlazar en posiciones específicas, por ejemplo en el terminal amino de pepticuerpos, o unirse al azar a una o más cadenas laterales del polipéptido. El uso de PEG para mejorar la capacidad terapéutica para los agentes de unión específicos, por ejemplo, pepticuerpos, y para anticuerpos humanizados en concreto, se describe 20 en la patente de los EE.UU. No. 6,133,426 de Gonzales et al, otorgada el 17 de octubre de 2000.

25 La descripción también contempla la derivación del péptido y/o parte del vehículo de los compuestos. Estas derivaciones pueden mejorar la solubilidad, absorción, vida media biológica, y similares, de los compuestos. Las porciones pueden, como alternativa, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable del compuesto y similares. Los ejemplos de derivados incluyen los compuestos donde:

30 1. El compuesto o alguna parte de este es cíclico. Por ejemplo, la parte de péptido puede modificarse para contener dos o más residuos de Cys (por ejemplo, en el enlazador), que podría ciclarse mediante la formación de enlaces disulfuro.

35 2. El compuesto está reticulado o es capaz de reticular entre moléculas. Por ejemplo, la parte de péptido puede modificarse para contener un residuo de Cys y, de ese modo, poder formar un enlace disulfuro intermolecular con una molécula similar. El compuesto puede reticularse además a través de su terminal C.

40 3. Uno o más enlaces (uniones) peptídicos [-C(O)NR-] se sustituyen por un enlace no peptídico. Los enlaces no peptídicos a modo de ejemplo son -CH2-carbamato [-CH2-OC(O)NR-], fosfonato, -CH2-sulfonamida [-CH2-S(O)2NR-], urea [-NHC(O) NH-], -CH2-amino secundaria y péptido alquilado [-C(O)NR6 - donde R6 es alquilo inferior].

45 4. El terminal N está derivado. Normalmente, el terminal N puede acilarse o modificarse para dar una amina sustituida. Los ejemplos de grupos derivados N terminales incluyen NRR1 (distinto de -NH2), -NRC(O)R1, -NRC(O)OR1, -NRS(O)2R1, -NHC(O)NHR1, succinimida o benciloxicarbonil-NH- (CBZ-NH-), donde R y R1 son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo inferior, y donde el anillo fenilo puede sustituirse con 1 a 3 substituyentes seleccionados del grupo que está constituido por alquilo C1-C4, alcoxi C1-C4, cloro y bromo.

50 5. El terminal C libre está derivado. Normalmente, el terminal C está esterificado o amidado. Por ejemplo, pueden usarse procedimientos descritos en la técnica para añadir (NH-CH2-CH2-NH2)2 a compuestos de la presente invención en el terminal C. Además, pueden usarse procedimientos descritos en la técnica para añadir -NH2 a compuestos de la presente invención en el terminal C. Los ejemplos de grupos derivados en terminal C incluyen, por ejemplo, -C(O)R2 donde R2 es alcoxi inferior o -NR3R4 donde R3 y R4 son independientemente hidrógeno o alquilo C1-C8 (preferiblemente alquilo C1-C4).

6. Un enlace disulfuro se reemplaza por otra porción de reticulación, preferentemente más estable (por ejemplo, un alquieno). Véase, por ejemplo, Bhatnagar (supra); Alberts et al, Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9 (1993).

55 7. Uno o más residuos de aminoácidos individuales están modificados. Se sabe que diversos agentes de derivación reaccionan de manera específica con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales, como se describe en detalle a continuación.

Los residuos de lisinilo y residuos amino terminales pueden reaccionar con anhídridos de ácido succínico o ácido carboxílico, que invierten la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pantanodiona; y la reacción con glicoxilato catalizada por transaminasasa.

Los residuos de arginilo pueden modificarse mediante la reacción con uno o con una combinación de varios reactivos convencionales, incluidos fenilgioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de residuos de arginilo requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la alta pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo arginina de epsilon-amino.

Se ha estudiado extensamente la modificación específica de residuos de tirosilo, con particular interés en la introducción de etiquetas espectrales en residuos de tirosilo mediante la reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más habitualmente se pueden utilizar N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies O-acetyl-tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.

10 Los grupos carboxilo de cadena lateral (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse de forma selectiva mediante la reacción con carbodiimidas ( $R'-N=C=N-R'$ ) como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo pueden convertirse en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

15 Los residuos de glutaminilo y asparaginilo pueden desamidarse para proporcionar los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo. En forma alternativa, estos residuos se desamidan en condiciones ácidas suaves. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Los residuos de cisteinilo pueden reemplazarse por residuos de aminoácidos u otras porciones ya sea para eliminar enlaces disulfuro o, por el contrario, para estabilizar las reticulaciones. Véase, por ejemplo Bhatnagar, (supra).

20 La derivación con agentes bifuncionales es útil para reticular los péptidos o sus derivados funcionales a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros vehículos macromoleculares. Los agentes de reticulación de uso habitual incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres disuccinimidílicos como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) y maleimidas bifuncionales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivantes como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato proporcionan compuestos intermedios fotoactivables que 25 pueden formar reticulaciones en presencia de luz. Como alternativa, se emplean matrices insolubles en agua reactivas, como hidratos de carbono activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de los EE.UU. Nos. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; y 4,330,440 para la inmovilización de proteínas.

30 Los grupos carbohidrato (oligosacárido) pueden unirse de manera conveniente a sitios que se sabe son sitios de glicosilación en proteínas. Generalmente, los oligosacáridos unidos a O se unen a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr), mientras que los oligosacáridos unidos a N se unen a residuos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Preferentemente, X es uno de los 19 aminoácidos naturales distinto de prolina. Las estructuras de los oligosacáridos unidos a N u O y los residuos de azúcar encontrados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra habitualmente en ambos es el ácido N-acetilneuramínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico es normalmente el residuo terminal de oligosacáridos enlazados tanto a N como a O, y, en base a su carga negativa, puede conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Tales sitios pueden incorporarse en el enlazador de los compuestos de la presente invención y están preferentemente glicosilados por una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamífero como CHO, BHK, COS). Sin embargo, tales 40 sitios pueden glicosilarse adicionalmente mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

45 Otras modificaciones posibles incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, oxidación del átomo de azufre en Cys, metilación de los grupos alfa-amino de lisina y arginina, y cadenas laterales de histidina (Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)).

50 La secuencia de ADN de cualquier parte del compuesto puede cambiarse a codones más compatibles con la célula receptora elegida. Para *E. coli*, que es la célula receptora preferida, se conocen en la técnica codones optimizados. Los codones pueden sustituirse para eliminar sitios de restricción o para incluir sitios de restricción silenciosos, que pueden ayudar al procesamiento del ADN en la célula receptora seleccionada. Las secuencias del vehículo, el enlazador y el ADN peptídico se pueden modificar para que incluyan cualquiera de los anteriores cambios en la secuencia.

#### Maduración de la afinidad

55 Se describen péptidos y pepticuerpos con "afinidad madura". Este procedimiento contempla el incremento de la afinidad o de la bioactividad de los péptidos y pepticuerpos de la presente invención utilizando la expresión en fagos u otras tecnologías de selección. En base a una secuencia de consenso (que se genera para una colección de péptidos relacionados), se pueden generar genotecas secundarias de expresión en fagos dirigidas donde los aminoácidos principales (determinados a partir de la secuencia consenso) se mantienen constantes o se desvían en frecuencia de aparición. En forma alternativa, se puede usar una secuencia de péptido individual para generar una

genoteca de expresión en fagos desviada y dirigida. La extensión de tales genotecas puede producir péptidos (que se pueden convertir en pepticuerpos) con un mejor enlace a la Ang-2 o con una bioactividad mejorada.

#### Análogos no peptídicos/miméticos proteicos

Además, también se contemplan los análogos no peptídicos que proporcionan una estructura estabilizada o menor biodegradación. Los análogos de miméticos peptídicos se pueden preparar en base a un péptido inhibidor seleccionado mediante sustitución de uno o más residuos por porciones no peptídicas. Preferentemente, las porciones no peptídicas permiten que el péptido retenga su conformación natural o estabilicen una conformación preferida, por ejemplo, bioactiva que mantiene la capacidad de reconocer y unirse a Ang-2. En un aspecto, el análogo/mimético resultante muestra mayor afinidad de unión para Ang-2. Un ejemplo de los procedimientos para la preparación de análogos de miméticos no peptídicos a partir de péptidos se describe en Nachman et al, *Regul. Pept.* 57: 359 - 370 (1995). Si se desea, los péptidos de la invención se pueden modificar, por ejemplo, mediante glicosilación, amidación, carboxilación, o fosforilación, o mediante la creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres, en particular ésteres C-terminal, y derivados de N-acilo de los péptidos. Los pepticuerpos también se pueden modificar para crear derivados de péptidos mediante la formación de complejos covalentes o no covalentes con otras porciones. Los complejos unidos de manera covalente se pueden preparar mediante la vinculación de las porciones químicas con grupos funcionales sobre las cadenas laterales de aminoácidos que comprenden los pepticuerpos, o en el terminal N- o terminal C-.

En particular, se prevé que los péptidos se pueden conjugar a un grupo indicador que incluye, a modo no taxativo, un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima (por ejemplo, que cataliza una reacción colorimétrica o fluorométrica), un substrato, una matriz sólida, o un vehículo (por ejemplo, biotina o avidina). Se describe una molécula que comprende una molécula de pepticuerpo, donde la molécula comprende preferentemente un grupo indicador seleccionado del grupo que consiste de un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima, un substrato, una matriz sólida, y un vehículo. Dichos marcadores son bien conocidos para los entendidos en la técnica, por ejemplo, los marcadores de biotina se contemplan particularmente. El uso de dichos marcadores es bien conocido en la técnica y se describe en, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; y 3,996,345. Cualquiera de los pepticuerpos de la presente invención puede comprender uno, dos, o más de cualquier de estos marcadores.

#### Métodos de fabricación de péptidos

Los péptidos de la presente invención se pueden generar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos péptidos se pueden sintetizar en solución o en un soporte sólido de conformidad con técnicas convencionales. Varios sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y se pueden usar de conformidad con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart and Young (supra); Tam et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, (1983); Merrifield, *Science* 232:341-347 (1986); Barany and Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany et al, *Int. J. Pep. Protein Res.*, 30:705-739 (1987) y la patente de los EE.UU. No. 5,424,398, cada una incorporada a la presente a modo de referencia.

Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida utilizan un copoli(estirenodivinilbenceno) que contiene 0,1-1,0 mM de aminas/g de polímero. Estos procedimientos para la síntesis de péptido utilizan protección con butiloxicarbonilo (t-BOC) o 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC) de grupos alfa-amino. Ambos procedimientos implican la síntesis por etapas donde se añade un único aminoácido a cada etapa comenzando a partir del terminal C del péptido (Véase, Coligan et al, *Curr. Prot. Immunol.*, Wiley Interscience, 1991, Unit 9). Finalizada la síntesis química, el péptido sintético se puede desproteger para eliminar los grupos bloqueadores de aminoácido t-BOC o FMOC y escindirse del polímero mediante el tratamiento con ácido a temperatura reducida (por ejemplo, HF líquido-10% de anisol por entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 1 hora a 0°C). Después de la evaporación de los reactivos, los péptidos se extraen del polímero con solución de ácido acético al 1% que después se liofiliza para producir el material bruto. Normalmente, esto se puede purificar mediante técnicas como la filtración de gel sobre SephadexG-15 utilizando un 5% de ácido acético como disolvente. La liofilización de fracciones apropiadas de la columna producirá los péptidos o derivados de péptido homogéneos, que después se pueden caracterizar mediante técnicas convencionales como análisis de aminoácidos, cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alto rendimiento, espectroscopía de absorción ultravioleta, rotación molar, solubilidad, y se pueden cuantificar mediante degradación de Edman de fase sólida.

Otros procedimientos, como la selección de péptidos a partir de una genoteca de expresión en fagos también están disponibles. Las genotecas pueden prepararse a partir de conjuntos de aminoácidos como se describe en la presente invención. La expresión en fagos puede ser particularmente eficaz en la identificación de péptidos útiles de conformidad con la invención. En resumen, se prepara una genoteca de fagos (utilizando, por ejemplo, fago ml 13, fd, o lambda), que muestra inserciones de 4 a aproximadamente 80 residuos de aminoácidos. Las inserciones pueden representar, por ejemplo, una disposición completamente degenerada o desviada. Posteriormente, se pueden seleccionar inserciones portadoras del fago que se unen al antígeno deseado. Este procedimiento se puede repetir mediante varios ciclos de reselección de fagos que se vinculan al antígeno deseado. Este proceso puede repetirse a través de varios ciclos de reselección de fagos que se vinculan al antígeno deseado. Las rondas repetidas conducen al enriquecimiento de los fagos portadores de secuencias concretas. Se puede llevar a cabo un

análisis de la secuencia de ADN para identificar las secuencias de los péptidos expresados. Se puede determinar la parte lineal mínima de la secuencia que se une al antígeno deseado. Se puede repetir el procedimiento utilizando una genoteca desviada que contiene inserciones que contienen parte o toda la porción lineal mínima más uno o más residuos degenerados adicionales cadena arriba o cadena abajo de los mismos. Estas técnicas pueden identificar péptidos de la invención con una afinidad de unión a Ang-2 todavía mayor que los agentes ya identificados en la presente.

Independientemente de la manera a través de la cual se preparan los péptidos, una molécula de ácido nucleico que codifica cada uno de tales péptidos y pepticuerpos puede generarse utilizando procedimientos de ADN recombinante convencionales. La secuencia de nucleótidos de las moléculas de ADN se puede manipular según sea apropiado sin cambiar la secuencia de aminoácidos que codifican para representar la degeneración del código de ácido nucleico así como la preferencia de codón en células receptoras concretas.

Las técnicas de ADN recombinante constituyen un procedimiento conveniente para preparar pepticuerpos de longitud completa y otros agentes proteicos grandes de enlace específico de la presente invención o fragmentos de los mismos. Una molécula de ADN que codifica el pepticuerpo o fragmento se puede insertar en un vector de expresión, que puede, a su vez, insertarse en una célula receptora para la producción del anticuerpo o fragmento.

En general, una molécula de ADN que codifica un péptido o pepticuerpo se puede obtener utilizando los procedimientos descritos en la presente en el apartado de Ejemplos. Las sondas y condiciones de hibridación típicas son aquellas establecidas en Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press [1994]). Después de la hibridación, la mancha sondada se puede lavar con una rigurosidad adecuada, en función de factores como el tamaño de la sonda, la homología esperada de la sonda para clonar, el tipo de genoteca que se selecciona y el número de clones que se selecciona. Los ejemplos de selección de alta rigurosidad son 0,1 X SSC, y 0,1% de SDS a una temperatura entre 50 -65°C.

También se pueden utilizar procedimientos de selección de dos híbridos de levadura para identificar péptidos de la invención que se enlazan al Ang-2. De este modo, el antígeno, o un fragmento de este, se puede utilizar para seleccionar genotecas de péptidos, que incluyen genotecas de expresión en fagos, para identificar y seleccionar agentes de enlace a Ang-2, por ejemplo, pepticuerpos, de la presente invención.

Como alternativa, se pueden utilizar varios sistemas de expresión en vector/receptor para contener y expresar los péptidos de la invención. Estos sistemas incluyen, a modo no taxativo, microorganismos, como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN plásmido o cósmido, de bacteriófago recombinante; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras, sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transfectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacteriana (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); sistemas de células animales. Las células de mamífero que son útiles en las producciones de proteína recombinante incluyen, a modo no taxativo, células VERO, células HeLa, líneas de células de ovario de Hámster Chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Los ejemplos de protocolos para la expresión recombinante de los péptidos se describen más adelante.

El término "vector de expresión" se refiere a un plásmido, fago, virus o vector, que expresa un polipéptido a partir de una secuencia de ADN (ARN). Un vector de expresión puede comprender una unidad de transcripción que comprende un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una estructura o secuencia que codifica el agente de unión que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias de inicio y terminación de la transcripción apropiadas. Las unidades de transcripción para uso en sistemas de expresión de levaduras o eucariotas incluyen, preferentemente, una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula receptora. Como alternativa, cuando se expresa la proteína recombinante sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo amino terminal metionilo. Este residuo se puede o no escindir posteriormente a partir de la proteína recombinante expresada, para proporcionar un producto de péptido final.

Por ejemplo, los péptidos se pueden expresar de manera recombinante en levadura utilizando un sistema de expresión comercialmente disponible, por ejemplo, el sistema de expresión en Pichia (Invitrogen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema también se basa en la secuencia pre-pro-alfa para dirigir la secreción, pero la transcripción del inserto está dirigida por el promotor de alcohol- oxidasa (AOX1) tras su inducción por metanol.

El péptido secretado se purifica del medio de crecimiento de levaduras utilizando, por ejemplo, los procedimientos usados para purificar el péptido de los sobrenadantes celulares de mamífero y bacterianos.

En forma alternativa, el ADNc que codifica el péptido puede clonarse en el vector de expresión de baculovirus pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Este vector puede usarse según las instrucciones del fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en medios libres de proteínas SF9 y para producir proteína recombinante. La proteína recombinante puede purificarse y concentrarse a partir de los medios utilizando

una columna de heparina- Sefarosa (Pharmacia).

Como alternativa, el péptido puede expresarse en un sistema de insectos. Los sistemas de insectos para la expresión de proteínas son bien conocidos por los entendidos en la técnica. En uno de estos sistemas se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños en 5 células de *Spodoptera frugiperda* o de *Trichoplusia larvae*. La secuencia que codifica el péptido se puede clonar en una región no esencial del virus, como el gen de polihedrina, y colocar bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción satisfactoria del péptido inactivará el gen de polihedrina y producirá virus recombinante que carece de la 10 proteína de recubrimiento. Los virus recombinantes se pueden usar para infectar células de *S. frugiperda* o *Trichoplusia larvae* donde se expresa el péptido. Smith et al, *J. Virol.* 46: 584 (1983); Engelhard et al, *Proc. Nat. Acad Sci. USA*, 91: 3224-7 (1994).

En otro ejemplo, la secuencia de ADN que codifica el péptido puede amplificarse mediante PCR y clonarse en un vector apropiado por ejemplo, pGEX-3X (Pharmacia). El vector pGEX se diseña para producir una proteína de fusión que comprende glutatión-S-transferasa (GST), codificada por el vector, y una proteína codificada por un fragmento de ADN insertado en el sitio de clonación del vector. Los cebadores para PCR pueden generarse para incluir, por 15 ejemplo, un sitio de escisión apropiado. Cuando la porción de fusión se utiliza únicamente para facilitar la expresión o, de otro modo, no es deseable como unión al péptido de interés, la proteína de fusión recombinante puede escindirse de la porción GST de la proteína de fusión. La construcción peptídica pGEX-3X/ágente de unión específico se transforma en células *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla CA) y transformadores individuales 20 aislados y crecidos. El ADN del plásmido de los transformadores individuales puede purificarse y secuenciarse parcialmente mediante el uso de un secuenciador automático para confirmar la presencia del inserto de ácido nucleico que codifica el agente de unión específico deseado en la orientación apropiada.

Ciertas composiciones peptídicas de la presente invención son aquellas donde un pepticuerpo se conjuga a cualquier péptido antitumoral, como el factor de necrosis tumoral (TNF). En un procedimiento particularmente preferido, las quimeras de los péptidos del agente de unión específico de TNF se generan como fusiones recombinantes con las secuencias que codifican el péptido fusionadas en el marco con las secuencias que codifican e TNF (Novagen, Madison, WI). El ADNc de péptido - TNF se puede clonar en el vector pET-11b (Novagen) y la expresión de los péptidos-TNF en BL21 *E. coli* se puede inducir de conformidad con las instrucciones del fabricante de pET11. Los péptidos de TNF solubles se pueden purificar a partir de lisados bacterianos mediante la preparación de sulfato de amonio, cromatografía de interacción hidrófoba sobre Fenil-Sefarosa 6 de flujo rápido, cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sefarosa de flujo rápido y cromatografía de filtración en gel sobre Sephacryl-S-300 HR.

La proteína de fusión, que se puede producir como un cuerpo de inclusión insoluble en las bacterias, se puede purificar de la siguiente manera. Las células receptoras se pueden sacrificar mediante centrifugación; lavarse en de 35 NaCl 0,15 M, 10 mM de Tris, pH 8, 1 mM de EDTA; y tratarse con 0,1 mg/ml de lisozima (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El lisado se puede eliminar mediante sonicación, y los desechos celulares se pueden granular mediante centrifugación durante 10 minutos a 12.000 X g. El gránulo que contiene la proteína de fusión se puede volver a suspender en 50 mM de Tris, pH 8, y 10 mM de EDTA, se separaron en fases sobre 50% de glicerol, y se centrifugaron durante 30 minutos a 6000 X g. El gránulo se volvió a suspender en solución salina tamponada con fosfato estándar (PBS) libre de Mg ++ y Ca ++. La proteína de fusión se puede 40 purificar adicionalmente mediante fraccionamiento del gránulo re suspendido en un SDS-PAGE desnaturizante (Sambrook et al, supra). El gel se puede sumergir en KCl 0,4 M para visualizar la proteína, que se puede escindir y electroeluir en tampón de desarrollo por gel que carece de SDS. Si se produce GST/proteína de fusión en las bacterias en forma de una proteína soluble, se puede purificar usando el módulo de purificación GST (Pharmacia).

La proteína de fusión se puede someter a digestión para escindir el GST del péptido de la invención. La reacción de 45 digestión (20 - 40 mg de proteína de fusión, 20 - 30 unidades de trombina humana, (4000 U/mg, Sigma) en 0,5 ml de PBS se puede incubar durante 16 - 48 horas a temperatura ambiente y cargarse en gel SDS-PAGE desnaturizante para fraccionar los productos de reacción. El gel se puede sumergir en KCl 0,4 M para visualizar las bandas de proteína. La identidad de la banda de proteína correspondiente al peso molecular esperado del péptido se puede 50 confirmar mediante análisis de secuencia de aminoácidos utilizando un secuenciador automático (Applied Biosystems Mode1473A, Foster City, CA). Como alternativa, la identidad se puede confirmar mediante la realización de HPLC y/o espectrometría de masas de los péptidos.

En forma alternativa, una secuencia de ADN que codifica el péptido puede clonarse en un plásmido que contiene un promotor deseado y, opcionalmente, una secuencia líder [Better et al, *Science* 240:1041-43 (1988)]. La secuencia de esta construcción puede confirmarse mediante secuenciación automática. Posteriormente, el plásmido puede transformarse en la cepa MC1061 de *E. coli* usando procedimientos convencionales que emplean la incubación con CaCl<sub>2</sub> y el tratamiento de choque térmico de las bacterias (Sambrook et al, supra). Las bacterias transformadas pueden cultivarse en un medio LB complementado con carbenicilina, y la producción de la proteína expresada puede inducirse mediante el crecimiento en un medio adecuado. Si está presente, la secuencia líder puede realizar la secreción del péptido y puede escindirse durante la secreción.

60 La proteína recombinante secretada puede purificarse a partir de los medios de cultivo bacteriano mediante los

procedimientos que se describen más adelante.

Los entendidos en la técnica conocen los sistemas receptores mamíferos para la expresión de la proteína recombinante. Las cepas de células receptoras pueden seleccionarse para una capacidad particular con el objeto de tratar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones postraduccionales que serán útiles para proporcionar

5 actividad de proteína. Dichas modificaciones de la proteína incluyen, a modo no taxativo, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Diferentes células receptoras, como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, y similares tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y se pueden escoger para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña introducida.

10 Es preferible que las células transformadas se utilicen para la producción de proteínas de alto rendimiento a largo plazo y dicha expresión estable es deseada. Una vez que dichas células se han transformado con vectores que contienen marcadores seleccionables junto con el casete de expresión deseado, se puede dejar que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El marcador seleccionable está diseñado para conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. Los grupos resistentes de células transformadas de forma estable pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo tisular adecuadas al tipo de célula.

15 Para recuperar las células transformadas para la producción de proteínas recombinantes se pueden usar varios sistemas de selección. Dichos sistemas de selección incluyen, a modo no taxativo, los genes de la timidina cinasa de HSV, de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y de adenina fosforribosiltransferasa, en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, se puede utilizar la resistencia anti-metabolitos como la base de selección para DHFR, que confiere resistencia a metotrexato; gpt que confiere resistencia a ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G418 y confiere resistencia a clorsulfurón; e higro que confiere resistencia a higromicina. Los genes seleccionables adicionales que pueden ser útiles incluyen trpB, que permite a las células 20 utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histidol en lugar de histidina. Los marcadores que proporcionan una indicación visual para la identificación de transformadores incluyen antocianinas,  $\beta$ -glucuronidasa y su sustrato, GUS y luciferasa y su sustrato, luciferina.

#### Purificación y repliegue de agentes de unión específicos

25 En algunos casos, los agentes de unión específicos, como los péptidos y/o pepticuerpos de la presente invención pueden necesitar replegarse y oxidarse para dar una estructura terciaria apropiada y generar enlaces de disulfuro con el fin de ser biológicamente activos. El repliegue puede realizarse utilizando varios procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, exponer el agente polipeptídico solubilizado a un pH normalmente superior a 7 en presencia de un agente caotrópico. La selección de un caótropo es similar a las 30 elecciones usadas para la solubilización de cuerpos de inclusión; sin embargo un caótropo se suele utilizar a una concentración inferior. Un ejemplo de un agente caotrópico es guanidina. En la mayoría de los casos, la solución de repliegue/oxidación contendrá también un agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para 35 generar un potencial redox concreto que permite que se produzcan intercambios de disulfuro para la formación de puentes de cisteína. Algunas parejas redox usadas habitualmente incluyen cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditiotreitol DTT/ditiano DTT, y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. En muchos casos, puede utilizarse 40 un codisolvente para aumentar la eficacia del repliegue. Los codisolventes de uso habitual incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, y arginina.

45 Puede ser deseable purificar los péptidos y pepticuerpos de la presente invención. Los entendidos en la técnica conocen las técnicas de purificación de proteínas. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento bruto de las fracciones proteináceas y no proteináceas. Habiendo separado el péptido y/o pepticuerpo de otras proteínas, el péptido o polipéptido de interés puede purificarse posteriormente mediante el uso de técnicas cromatográficas y 50 electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o la purificación hasta la homogeneidad). Ciertos procedimientos analíticos adecuados para la preparación de pepticuerpos y péptidos de la presente invención son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida, y enfoque isoelectrónico. Un procedimiento particularmente eficaz de purificación de péptidos es la cromatografía líquida rápida de proteínas o incluso HPLC.

55 Ciertos aspectos se refieren a la purificación, y en realizaciones particulares, a la purificación sustancial, de un pepticuerpo o péptido de la presente invención. La expresión pepticuerpo o péptido purificado, como se utiliza en la presente, pretende referirse a una composición, que puede aislarse de otros componentes, donde el pepticuerpo o péptido se purifica hasta un grado con respecto al estado en que puede obtenerse de manera natural. Por lo tanto, un péptido o pepticuerpo purificado se refiere también a un pepticuerpo o péptido que está libre del entorno en el que puede producirse de manera natural.

Generalmente, "purificado" se referirá a una composición de péptido o pepticuerpo que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros diversos componentes y que conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificada", esta designación hará referencia a una

composición de péptido o pepticuerpo donde el péptido o pepticuerpo forma el componente principal de la composición, de modo que constituye aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o más de las proteínas en la composición.

5 Los entendidos en la técnica conocerán diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación del péptido o pepticuerpo a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad vinculante específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de péptido o pepticuerpo dentro de una fracción mediante análisis de SDS/PAGE. Un procedimiento preferido para evaluar la pureza de una fracción de péptido o pepticuerpo es calcular la actividad vinculante específica de la fracción, comparar dicha actividad con la actividad vinculante del extracto inicial y, por ende, calcular el grado de purificación, evaluado en la presente mediante "un múltiplo de purificación". Las unidades reales utilizadas para representar la cantidad de actividad vinculante dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo concreta elegida para seguir la purificación y si el pepticuerpo o péptido muestra o no una actividad vinculante detectable.

10 15 Los entendidos en la técnica conocerán diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación. Éstas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos (inmunoprecipitación) y similares o mediante desnaturalización térmica, seguida de centrifugación; etapas de cromatografía como cromatografía de afinidad (por ejemplo, proteína-A-Sefarosa), cromatografía de intercambio iónico, de filtración en gel, de fase inversa, de hidroxiapatita y de afinidad; enfoque isoelectrónico; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Como se conoce generalmente en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de 20 25 purificación puede cambiarse o que ciertas etapas puedan omitirse, y todavía dar como resultado un procedimiento adecuado para la preparación de un agente de unión específico sustancialmente purificado.

30 No existe ningún requisito general alguno de que el péptido o pepticuerpo de la presente invención siempre se proporcione en su estado más purificado. De hecho, se prevé que productos de agentes de unión menos específicos tendrán utilidad en ciertas realizaciones. La purificación parcial puede realizarse utilizando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando formas diferentes del mismo esquema general de purificación. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía de columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC dará como resultado, generalmente, una purificación tantas "veces" mayor que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los procedimientos que muestran un grado inferior de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del péptido o pepticuerpo o en el mantenimiento de la actividad vinculante del péptido o pepticuerpo.

35 Se sabe que la migración de un péptido o polipéptido puede variar, algunas veces de manera significativa, con diferentes condiciones de SDS/PAGE [Capaldi et al, Biochem Biophys Res Comm, 76: 425 (1977)]. Por lo tanto, se apreciará que, en condiciones de electroforesis diferentes, los pesos moleculares aparentes de los productos de expresión de agentes de unión específicos purificados o parcialmente purificados pueden variar.

### 35 **Ensayos de unión**

40 Los ensayos de unión inmunológica típicamente utilizan un agente de captura para unirse específicamente al antígeno diana del analito y a menudo inmovilizarlo. El agente de captura es una porción que específicamente se une al analito. El agente de captura puede ser un péptido o pepticuerpo o fragmento de este, que específicamente se enlaza con Ang-2. Estos ensayos de unión inmunológicos son bien conocidos en la técnica [Asai, ed., Methods in Cell Biology, Vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., New York (1993)]

45 Los ensayos de unión inmunológicos frecuentemente utilizan un agente marcador que señalará la existencia del complejo enlazado, formado por el agente de captura y el antígeno. El agente marcador puede ser una de las moléculas que comprenden el complejo enlazado, es decir, puede ser un agente de unión específico marcado o un anticuerpo de un antiagente de unión específico marcado. Como alternativa, el agente marcador puede ser una tercera molécula, generalmente otro anticuerpo, que se enlaza con complejo unido. El agente marcador puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de un anti-agente de unión específico que lleva una marca. El segundo anticuerpo, específico del complejo enlazado, puede carecer de una marca, pero se puede unir mediante una cuarta molécula específica a las especies de anticuerpos donde el segundo anticuerpo es miembro. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede modificarse con una porción detectable, como biotina, que después se puede unir mediante una cuarta molécula, como estreptavidina marcada con enzima. Otras proteínas capaces de enlazarse específicamente a las regiones constantes de inmunoglobulina, como la proteína A o proteína G, también se pueden usar como agente marcador. Estas proteínas vinculantes son constituyentes normales de las paredes celulares de bacterias estreptocócicas y muestran una fuerte reactividad no inmunogénica con las regiones constantes de inmunoglobulina de diversas especies. Akerstrom, J. Immunol., 135:2589-2542 (1985); Chaubert, Mod. Pathol., 10:585-591 (1997).

55 50 A lo largo de los ensayos, se pueden requerir las etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar entre aproximadamente 5 segundos y varias horas, preferentemente entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, el analito, el volumen de solución, las concentraciones, y similares. Usualmente, los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque se pueden llevar a cabo en un

intervalo de temperaturas.

**A. Ensayos de unión no competitivos**

Los ensayos de unión inmunológicos pueden ser del tipo no competitivo. Estos ensayos tienen una cantidad de analito capturado que se mide directamente. Por ejemplo, en un ensayo de tipo "sándwich" preferido, el agente de captura (anticuerpo o pepticuerpo) puede enlazarse directamente a un sustrato sólido donde se inmoviliza. Estos agentes de captura inmovilizados capturan (se unen a) el antígeno presente en la muestra de ensayo. La proteína así inmovilizada posteriormente se enlaza a un agente marcador, como un segundo anticuerpo que tiene una marca. En otro ensayo de tipo sándwich preferido, el segundo anticuerpo carece de una marca, pero se puede unir mediante un anticuerpo marcado específico para anticuerpos de las especies a partir de las que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo también se puede modificar con una porción detectable, como biotina, al que se puede unir específicamente una tercera molécula marcada, como estreptavidina. Véase Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ch 14, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988).

**B. Ensayos de unión competitivos**

Los ensayos de unión inmunológicos pueden ser del tipo competitivo. La cantidad de analito presente en la muestra se mide indirectamente mediante la medición de la cantidad de un analito añadido desplazado, o que compite lejos, a partir de un agente de captura (anticuerpo o pepticuerpo) mediante el analito presente en la muestra. En un ensayo de enlace competitivo preferido, se añade una cantidad conocida de analito, normalmente marcado, a la muestra y la muestra se pone posteriormente en contacto con el agente de captura. La cantidad de analito marcado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra (Véase, Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cap. 14, pp. 579-583, supra).

En otro ensayo de enlace competitivo preferido el agente de captura se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La cantidad de proteína unida al agente de captura se puede determinar mediante la medición de la cantidad de proteína presente en un complejo proteína/anticuerpo o, como alternativa, mediante la medición de la cantidad de proteína remanente que no está formando un complejo. La cantidad de proteína puede detectarse mediante la provisión de una proteína marcada. Harlow and Lane (supra).

En otro ensayo de enlace competitivo preferido se utiliza la inhibición de hapteno. Aquí, se inmoviliza un analito conocido sobre un sustrato sólido. Se añade una cantidad conocida de anticuerpo a la muestra y la muestra se pone en contacto con el analito inmovilizado. La cantidad de anticuerpo unido al analito inmovilizado es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. La cantidad de anticuerpo inmovilizado se puede detectar mediante la detección de la fracción inmovilizada de anticuerpo o la fracción que permanece en solución. La detección puede ser directa cuando el anticuerpo está marcado o indirecta mediante la posterior adición de una porción marcada que se enlaza de manera específica al anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

**C. Utilización de ensayos de unión competitivos**

Los ensayos de unión competitivos se pueden usar para determinaciones de reacción cruzada que permiten a los entendidos en la técnica determinar si un complejo de proteínas o de enzimas que es reconocido por un pepticuerpo es la proteína deseada y no una molécula de reacción cruzada o para determinar si el pepticuerpo es específico del antígeno y no se enlaza a antígenos no relacionados. En ensayos de este tipo, el antígeno se puede inmovilizar a un soporte sólido y una mezcla de proteína desconocida se añade al ensayo, que competirá con el enlace de los pepticuerpos a la proteína inmovilizada. La molécula de competición también se une a uno o más antígenos no relacionados con el antígeno. La capacidad de las proteínas para competir con el enlace de los pepticuerpos al antígeno inmovilizado se compara con el enlace mediante la misma proteína que se inmovilizó al soporte sólido para determinar la reactividad cruzada de la mezcla de proteínas.

**D. Otros ensayos de unión**

Se describen procedimientos de Western blot para detectar o cuantificar la presencia de Ang-2 en una muestra. La técnica generalmente comprende separar proteínas de la muestra mediante electroforesis en gel en base al peso molecular y transferir las proteínas a un soporte sólido adecuado, como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o un filtro de nailon derivado. La muestra se incuba con los pepticuerpos o fragmento de los mismos que se unen específicamente a Ang-2 y se detecta el complejo resultante. Estos pepticuerpos pueden marcarse directamente o, como alternativa, pueden detectarse posteriormente utilizando anticuerpos marcados que se enlazan específicamente al pepticuerpo.

**Ensayos diagnósticos**

Los agentes de enlace derivados, como péptidos y pepticuerpos o fragmentos de estos, descritos en la presente son útiles para el diagnóstico de trastornos o enfermedades caracterizadas por la expresión de Ang-2 o subunidades, o en ensayos para controlar a los pacientes que se están tratando con inductores de Ang-2, sus fragmentos, agonistas o inhibidores de la actividad de Ang-2. Entre los ensayos diagnósticos para Ang-2 se incluyen procedimientos que usan un pepticuerpo y un marcador para detectar Ang-2 en fluidos del cuerpo humano o extractos de células o

tejidos. Los pepticuerpos pueden utilizarse con o sin modificación. En un ensayo de diagnóstico preferido, los pepticuerpos se marcarán mediante unión de, por ejemplo, una marca o una molécula reportera. Se conoce una amplia diversidad de marcas y moléculas indicadoras, alguna de las cuales ya se han descrito en la presente. En particular, son útiles para el diagnóstico de una enfermedad humana.

- 5 En la técnica se conocen diversos protocolos para medir las proteínas de Ang-2 que usan pepticuerpos específicos para la proteína respectiva. Los ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo de dos puntos basado en anticuerpos monoclonales utilizando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítopos no interferentes sobre Ang-2, pero se puede emplear un ensayo de enlace competitivo. Estos ensayos 10 se describen, por ejemplo, en Maddox et al, J. Exp. Med., 158:1211 (1983).

Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico, habitualmente se establecen valores normales o estándar para la expresión de Ang-2 humana. Esta determinación se puede llevar a cabo mediante la combinación de fluidos corporales o extractos de células de sujetos normales, preferentemente seres humanos, con un pepticuerpo para Ang-2, en condiciones adecuadas para la formación de complejos que se conocen en la técnica. La cantidad de 15 formación de complejo estándar se puede cuantificar mediante la comparación del enlace de los pepticuerpos a cantidades conocidas de proteína de Ang-2, tanto con muestras control como de enfermedad. Posteriormente, los valores estándar obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por una enfermedad. La desviación entre los valores estándar y del sujeto sugiere un papel para Ang-2 en el estado patológico.

- 20 Para aplicaciones de diagnóstico, en ciertas realizaciones los pepticuerpos o péptidos típicamente se marcarán con una porción detectable. La porción detectable puede ser uno que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la porción detectable puede ser un radioisótopo, como  $^{3H}$ ,  $^{14C}$ ,  $^{32}P$ ,  $^{35}S$ , o  $^{125}I$ , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una 25 enzima, como fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o peroxidasa de rábano. Bayer et al, Meth. Enz., 184: 138-163, (1990).

#### Enfermedades

La presente invención proporciona un agente de unión que es un péptido, un pepticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo que se enlaza con Ang-2 que es útil para el tratamiento de enfermedades y trastornos 30 patológicos humanos. Los agentes que modulan la actividad vinculante de Ang-2, u otra actividad celular, se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos para potenciar sus efectos terapéuticos o disminuir los efectos secundarios potenciales.

En un aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos para su uso en procedimientos útiles para el 35 tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por niveles no deseables o aberrantes de actividad de Ang-2 en una célula. Estas enfermedades incluyen cánceres y otros trastornos hiperproliferativos, como hiperplasia, psoriasis, dermatitis de contacto, trastornos inmunológicos e infertilidad.

Los procedimientos para tratar el cáncer en un animal, incluso en seres humanos, que comprenden la administración 40 al animal de una cantidad eficaz de un agente de unión específico, como un pepticuerpo que inhibe o disminuye la actividad de Ang-2 se describen en la presente. Se describen los procedimientos de inhibición del crecimiento de células cancerosas, que incluyen los procesos de proliferación celular, invasividad y metástasis en sistemas biológicos. Los procedimientos incluyen el uso de un compuesto de la invención como un inhibidor del crecimiento 45 de células cancerosas. Preferentemente, los procedimientos se emplean para reducir o inhibir el crecimiento de células cancerosas, la invasividad, la metástasis, o la incidencia tumoral en animales vivientes, como mamíferos. Los procedimientos se adaptan inmediatamente para su uso en sistemas de ensayo, por ejemplo, el ensayo del crecimiento de células cancerosas y propiedades de las mismas, así como la identificación de compuestos que afectan el crecimiento de células cancerosas.

Los cánceres tratables a través de los procedimientos descritos se producen preferentemente en mamíferos. Los 50 mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos y otros primates, así como mascotas como perros y gatos, animales de laboratorio como ratas, ratones y conejos, y animales de granja como caballos, cerdos, ovejas y ganado.

Los tumores y neoplasias incluyen crecimientos de células de tejido en donde la multiplicación de células es 55 incontrolable y progresiva. Algunos de dichos crecimientos son benignos, pero otros se consideran malignos y pueden derivar en la muerte del organismo. Las neoplasias o cánceres malignos se distinguen de los benignos en que, además de la proliferación celular agresiva, pueden invadir los tejidos circundantes y derivar a metástasis. Además, las neoplasias malignas se caracterizan por mostrar una mayor pérdida de diferenciación (mayor desdiferenciación) y de su organización en relación con el otro y los tejidos circundantes. Esta propiedad también se denomina "anaplasia".

Las neoplasias tratables también incluyen tumores sólidos, es decir, carcinomas y sarcomas. Los carcinomas incluyen aquellas neoplasias malignas derivadas de células epiteliales que se infiltran en (invaden) los tejidos

circundantes y dan lugar a metástasis. Los adenocarcinomas son carcinomas derivados del tejido glandular, o que forman estructuras glandulares reconocidas. Otra categoría amplia o cánceres incluyen sarcomas, que son tumores cuyas células están grabadas en una sustancia fibrilar u homogénea como el tejido conectivo embrionario. La invención puede permitir el tratamiento de cánceres del sistema mieloide o linfoide, incluso leucemias, linfomas y otros cánceres que no suelen estar presentes en una masa tumoral pero se distribuyen en los sistemas vasculares o linforeticulares.

5 El tipo de células cancerígenas o tumorales susceptibles de tratamiento incluyen por ejemplo, tumores productores de ACTH; leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónico, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T; cáncer del endometrio; cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas y no pequeñas), efusión peritoneal maligna, efusión pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, glioma, linfoma no-Hodgkin, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de ovario (células germinales), cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de próstata, retinoblastoma, cáncer de piel, sarcoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, neoplasias trofoblásticas, cáncer de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva, y tumor de Wilm.

10 Se describe el tratamiento de algunos tipos de cánceres definidos en forma experimental. En estos tratamientos ilustrativos se han utilizado modelos *in vivo* e *in vitro* de vanguardia. Estos procedimientos pueden utilizarse para identificar agentes que pueden ser eficaces en los regímenes de tratamiento *in vivo*. Sin embargo, se entenderá que el procedimiento no se restringe al tratamiento de estos tipos de tumores, pero se extiende a cualquier tumor sólido derivado del sistema del órgano. Los cánceres cuya invasividad o metástasis se asocia con la actividad o expresión 15 de Ang-2 son susceptibles específicamente de ser inhibidos o aún inducidos a retroceder.

20 Se describe un compuesto de la invención como un peptiduero en combinación con otro agente quimioterapéutico 25 antineoplásico como cualquier agente quimioterapéutico convencional. La combinación de un agente de unión específico con dichos otros agentes puede potenciar el protocolo quimioterapéutico. Los numerosos protocolos quimioterapéuticos estarán presentes en la mente del medico calificado como capaz de incorporar al procedimiento. Cualquier agente quimioterapéutico puede utilizarse, incluso los agentes alquilantes, antimetabolitos, hormonas y antagonistas, radioisótopos así como también productos naturales.

30 Por ejemplo, el compuesto de la invención puede administrarse como un antibiótico, como doxorubicina y otros 35 análogos de antraciclinas, mostaza nitrogenada como ciclofosfamida, análogos de pirimidina como 5-fluorouracilo, cisplatino, hidroxiurea, taxol, y sus derivados naturales y sintéticos y similares. Como otro ejemplo, en el caso de tumores mixtos, como adenocarcinoma de mama, donde los tumores incluyen células dependientes e independientes de gonadotropina, el compuesto se puede administrar junto con leuprolida o goserelina (análogos 40 peptídicos sintéticos de LH-RH). Otros protocolos antineoplásicos incluyen el uso de un compuesto de tetraciclina con otra modalidad de tratamiento, por ejemplo, cirugía, radiación, etc, también denominados en la presente como "modalidades antineoplásicas adjuntas". Por lo tanto, el procedimiento puede emplearse como dichos regímenes convencionales con el beneficio de reducir los efectos adversos y mejorar la eficacia.

45 Se describen las composiciones y procedimientos útiles para el tratamiento de una amplia variedad de cánceres, 50 incluso tumores sólidos y leucemias. Los tipos de cáncer que pueden tratarse incluyen, a modo no taxativo: adenocarcinoma de mama, próstata y colon; todas las formas de carcinoma broncogénico de pulmón; mieloide; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; branquioma; síndrome carcinoide maligno; enfermedad cardíaca carcinoide; carcinoma (por ej., Walker, células basales, basaloïdes, Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, Krebs 2, células de Merkel, mucinoso, de pulmón de células no pequeñas, de células en avena, papilar, cirroso, bronquilar, broncoquénico, de células escamosas y transicionales); trastornos histiocíticos, leucemia, histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin; carcinoma de células pulmonares pequeñas inmunoproliferativo; linfoma no-Hodgkin; plasmacitoma; reticuloendoteliosis; melanoma; condroblastoma, condroma, condrosarcoma, fibroma, fibrosarcoma, tumor de células gigantes; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; cordoma; craneofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; 55 mesonefroma; miosarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; tumor trofoblástico. Además, los siguientes tipos de cánceres también pueden tratarse: adenoma, colangioma; colesteatoma; ciclindroma; cistadeocarcinoma; cistadenoma; tumor de células granulosas; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumor de células insulares; tumor de células de Leydig; papiloma; tumor de células de Sertoli; tumor de células teca; leiomioma; leiomirosarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rabdomioma; rabdomiosarcoma; ependimoma; 60 ganglioneuroma; glioma; medulloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepiteloma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma no cromafina; angiokeratoma; hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatosis; glomangioma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; linfangioma; linfangiomatosis; linfangiosarcoma; pinealoma; carcinosarcoma; condrosarcoma; cistosarcoma filoide; fibrosarcoma; hemangiosarcoma; leiomirosarcoma; leucosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; miosarcoma; mixosarcoma; carcinoma ovárico; rabdomiosarcoma; sarcoma; neoplasias; 65 nerofibromatosis y displasia cervical.

Otro aspecto descrito es utilizar los materiales y los procedimientos de la presente invención para prevenir y/o tratar cualquier trastorno hiperproliferativo de la piel, incluso psoriasis y dermatitis por contacto u otras enfermedades hiperproliferativas. Se ha demostrado que los pacientes con psoriasis y dermatitis por contacto han elevado su actividad de Ang-2 dentro de estas lesiones [Ogoshi et al, J. Inv. Dermatol., 110:818-23 (1998)]. Preferentemente, los agentes de unión específicos para Ang-2 se utilizarán en combinación con otros agentes farmacéuticos para tratar seres humanos que muestran estos síntomas clínicos. Los agentes de unión específicos pueden administrarse utilizando cualquiera de los varios vehículos a través de las vías de administración descritas en la presente y otras vías que son conocidas por los entendidos en la técnica.

Otros aspectos descritos incluyen el tratamiento de varias retinopatías (incluso la retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con la edad) donde está involucrada la angiogénesis, así como también trastornos/enfermedades del tracto reproductor femenino como endometriosis, fibroides uterinas y otros trastornos asociados con la proliferación vascular disfuncional (incluso el crecimiento microvascular endometrial) durante el ciclo reproductivo femenino.

Otro aspecto descrito se relaciona con el tratamiento del crecimiento vascular anormal, que incluye las malformaciones arteriovenosas cerebrales (AVM), la lesión y reparación de la mucosa gastrointestinal, la ulceración de la mucosa gastroduodenal en pacientes con una historia de enfermedad ulcerosa péptica, que incluye isqueria que resulta de un ACV, un amplio espectro de trastornos vasculares pulmonares en enfermedades del hígado y la hipertensión portal en pacientes con hipertensión portal no hepática.

Otro aspecto descrito es la prevención de cánceres utilizando las composiciones y procedimientos proporcionados en la presente invención. Dichos reactivos incluirán agentes de unión específicos como pepticuerpos contra Ang-2.

#### Composiciones Farmacéuticas

Se describen las composiciones farmacéuticas de agentes de unión específicos de Ang-2 como pepticuerpos. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos se describen con detalle en, por ejemplo, la patente de los EE.UU. No 6,171,586, de Lam et al, otorgada el 9 de enero de 2001. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un agente de unión específico, como un anticuerpo, o un fragmento, una variante, derivado o fusión de este, como se describe en la presente, en una mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden agentes de unión específicos antagonistas que modulan parcial o completamente al menos una actividad biológica de Ang-2 en una mezcla con un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los agentes de unión específicos estarán suficientemente purificados para la administración a un animal.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, a modo no taxativo, aminoácidos (como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (como ácido ascórbico, sulfito de sodio o bisulfito sódico); tampones (como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes volumétricos (como manitol o glicina), agentes quelantes (como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes de complejación (como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-betaciclodextrina); rellenos; monosacáridos; disacáridos y otros hidratos de carbono (como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes; agentes aromatizantes y de dilución; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones de formación de sal (como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos como polisorbato 20, polisorbato 80, trítón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metal alcalino (preferentemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remingtons Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Macle Publishing Company, 1990).

La composición farmacéutica óptima será determinada por un entendido en la técnica en función de, por ejemplo, la vía de administración pretendida, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, supra. Dichas composiciones pueden influir sobre el estado físico, la estabilidad, la velocidad de la liberación in vivo y la velocidad del aclaramiento in vivo del agente de unión específico.

El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o fluido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales habituales en composiciones para la administración parenteral. Otros ejemplos de vehículos son solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica. Otros ejemplos de composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de un pH

de aproximadamente 7,0-8,5, o tampón acetato de un pH de aproximadamente 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado de este. En una realización, se pueden preparar composiciones de agentes de unión para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, supra) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, el producto de agente de unión puede formularse como liofilizado usando excipientes apropiados como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden seleccionarse para la administración parenteral. Como alternativa, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para liberación enteral, por ejemplo, por vía oral, por vía auditiva, por vía oftálmica, por vía rectal, por vía vaginal. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de los conocimientos de la técnica.

Los componentes de formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un pH de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

Cuando se considera la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en la presente invención pueden tener la forma de una solución acuosa, parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que comprende el agente de unión específico deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril donde un agente de unión se formula como una solución isotónica, estéril, conservada de manera apropiada. Otra preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporciona la liberación controlada o sostenida del producto que, por tanto, puede administrarse por medio de una inyección de liberación lenta. También puede utilizarse ácido hialurónico y esto puede tener el efecto de estimular la duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración de fármacos implantables.

En otro aspecto, se pueden producir formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, como la solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Adicionalmente se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, como oleato de etilo, triglicéridos, o liposomas. Los aminopolímeros poliacidónicos no lipídicos pueden utilizarse para la administración. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

En otra realización, se puede formular una composición farmacéutica para inhalación. Por ejemplo, un agente de unión puede formularse como polvo seco para inhalación. También pueden formularse soluciones para inhalación de moléculas de ácido nucleico o de polipéptido con un propulsor para la administración de aerosol. En otra realización, las soluciones pueden nebulizarse. Se describe además la administración pulmonar en la solicitud de PCT No. PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

También se prevé que ciertas formulaciones pueden administrarse por vía oral. Se pueden formular moléculas de agente de unión que se administran de este modo con o sin los vehículos usados normalmente en la composición de formas de dosificación sólidas, como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto del trato gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula de agente de unión. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral también se pueden formular utilizando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica con posologías adecuadas para la administración oral. Dichos vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para la ingestión por el paciente.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse mediante la combinación de compuestos activos con excipientes sólidos y el procesamiento de la mezcla de gránulos resultante (opcionalmente después de moler), para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Si se desea, se pueden añadir agentes auxiliares adecuados. Los excipientes adecuados incluyen rellenos de hidratos de carbono o proteínas, como azúcares, incluidos lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, papa u otras plantas; celulosa, como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; gomas, incluidos arábiga y tragacanto; y proteínas, como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, como la polivinilpirrolidona reticulada, agar y ácido algínico o una sal de estos, como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se pueden usar junto con recubrimientos adecuados, como soluciones de azúcar concentrado, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación de productos o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir dosificación.

5 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral también incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como también cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un revestimiento como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con rellenos o aglutinantes, como lactosa o almidones, lubricantes, como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las 10 cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, como aceites grasos, líquido o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

10 Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de agente de unión en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse soluciones en forma de dosis unitaria. 15 Los excipientes adecuados incluyen, a modo no taxativo, diluyentes inertes, como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes de unión, como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

20 Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los entendidos en la técnica, e incluyen formulaciones que implican moléculas de agente de unión en formulaciones de administración sostenida o controlada. Los entendidos en la técnica conocen también técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, como vehículos de liposoma, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación lenta. Véase, por ejemplo, el documento PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. 25 Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímero semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (U.S. 3,773,919, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato [Sidman et al, Biopolymers, 22:547-556 (1983)], poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) [Langer et al, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981); y [Langer et al, Chem. Tech., 12:98-105(1982)], acetato de etilenvinilo (Langer et al, supra) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988). Las composiciones de liberación 30 sostenida también incluyen liposomas, que pueden prepararse mediante cualquier de varios procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:3688-3692 (1985); EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949.

35 La composición farmacéutica que se ha de utilizar para la administración in vivo normalmente debe ser estéril. Esto puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Si la composición está liofilizada, la esterilización utilizando este procedimiento puede realizarse antes de o tras la liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en solución. Además, las 40 composiciones parenterales se colocan generalmente en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, un vial o bolsa de solución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

45 Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, esta puede almacenarse en viales estériles como solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en forma lista para su uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

50 En la presente se describen kits para producir una unidad de administración en dosis única. Los kits pueden 45 contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. Se describen kits que pueden contener jeringas precargadas de una única cámara o múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquidos y liojeringas).

55 Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que ha de emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos y contexto terapéuticos. Un entendido en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que se utiliza la molécula de agente de unión, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y estado (la edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede valorar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis diaria típica podría variar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg o más, en función de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede variar desde 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o de 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg; o de 5 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos de animales, como ratones, ratas, conejos, perros, cerdos o monos. Un modelo de animal

también se puede utilizar para determinar el rango de concentraciones adecuado y la vía de administración. Tal información se puede usar posteriormente para determinar dosis útiles y vías de administración en seres humanos

- 5 La dosificación exacta se determinará a la luz de los factores relacionados con la persona que requiere el tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del compuesto activo o para mantener el efecto deseado. Entre los factores que se pueden tener en cuenta se incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general de la persona, la edad, el peso y el sexo, la hora y la frecuencia de administración, las combinaciones de fármacos, las sensibilidades de la reacción y la respuesta al tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas en función de la vida media y el índice de aclaramiento de la formulación concreta.
- 10 La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de agente de unión en la formulación usada. Normalmente, una composición se administra hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como dosis única, o como dosis múltiple (en las concentraciones/dosificaciones iguales o diferentes) con respecto al tiempo o como infusión continua. De manera rutinaria se realiza un perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada. Pueden comprobarse dosificaciones apropiadas mediante el uso de datos de respuesta a la dosis apropiados.
- 15 La vía de administración de la composición farmacéutica según los procedimientos conocidos, por ejemplo por vía oral, a través de inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatoso), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intraleisional, vías intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, uretral, vaginal o rectal, mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. Cuando se deseé, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.
- 20 Alternativa o adicionalmente, la composición puede administrarse por vía local por medio de la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el cual la molécula deseada se ha absorbido o encapsulado. Cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser por medio de difusión, bolo de liberación gradual o administración continua.
- 25 En algunos casos puede ser deseable utilizar composiciones farmacéuticas de manera ex vivo. En tales casos, las células, los tejidos u órganos que se han extraído del paciente se exponen a las composiciones farmacéuticas tras lo cual las células, los tejidos y/u órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.
- 30 En otros casos, un agente de unión de la presente invención, como un peptícuero, puede administrarse mediante la implantación de ciertas células que se han modificado genéticamente, usando procedimientos como los descritos en la presente, para expresar y secretar el polipéptido. Dichas células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Opcionalmente, las células pueden inmortalizarse. Con el fin de reducir la probabilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son, normalmente, membranas o revestimientos poliméricos, semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación de los productos de proteína pero evitan la destrucción de las células mediante el sistema inmune del paciente o mediante otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.
- 35 40 Terapia de combinación
- 45 Los agentes de unión específicos que se describen en la presente, como peptícueros, se pueden utilizar en combinación con otros agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades asociadas a la expresión de Ang-2. Estos otros agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo tratamiento por radiación, quimioterapia, y terapias dirigidas como Herceptin<sup>TM</sup>, Rituxan<sup>TM</sup>, Gleevec<sup>TM</sup> y similares.
- 50 55 El tratamiento con quimioterapia puede emplear agentes anti-neoplásicos que incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes como mostaza nitrogenada, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, mefálan y clorambucilo, nitrosoureas como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (meta-CCNU); etiliminas/metilmelamina como trietilmelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametilmelamina (HMM, altretamina); sulfonatos de alquilo como busulfán; triazinas como dacarbazina (DTIC); antimetabolitos que incluyen análogos de ácido fólico, como metotrexato y trimetrexato, análogos de pirimidina, como 5-fluorouracilo, fluorodeoxiuridina, gencitabina, citosina arabinósido (AraC, citarabina), 5-azacitidina, 2,2'-difluorodeoxicitidina, análogos de purina como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fludarabina fosfato y 2-clorodeoxiadenosina (cladribina, 2-CdA); productos naturales que incluyen fármacos antimicóticos como paclitaxel, alcaloides de vinca, que incluyen vinblastina (VLB), vincristina, y vinorelbina, taxotere, estramustina y fosfato de estramustina; pipodophilotoxinas como etopósido y tenipósido; antibióticos, como actimomicina D, daunomicina (rubidomicina), doxorubicina, mitoxantrona, idarubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C, y actinomicina; enzimas como L-asparaginasa; modificadores de la respuesta biológica como interferón-alfa, IL-2, G-CSF y GM-CSF; agentes varios, que incluyen complejos de coordinación de platino

como cisplatino y carboplatino, antracenedionas como mitoxantrona, urea sustituida como hidroxiurea, derivados de metilhidrazina que incluyen N-metilhidrazina (MIH) y procarbazina, supresores adrenocorticales como mitotano (o p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas incluso antagonistas adrenocorticosteroides como prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; progestina como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol, estrógeno como dietilstilbestrol y equivalentes de etinil estradiol; antiestrógeno como tamoxifeno; andrógenos que incluyen propionato de testosterona y equivalentes de fluoximesterona; antiandrógenos como flutamida, análogos de hormonas que liberan gonadotropina y leuprolida; y antiandrógenos no esteroideos como flutamida.

5 La terapia de combinación con factores de crecimiento pueden incluir citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento, u otros factores hematopoyéticos como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, GM-CSF, trombopoietina, factor de células madre y eritropoietina. Otras composiciones pueden incluir angiopoietinas conocidas, por ejemplo Ang-1, -2, -4, -Y y/o el polipéptido de tipo Ang y/o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los factores de crecimiento incluyen angiogenina, proteínamorfogénica de hueso -1, proteína morfogénica de hueso-2, proteínamorfogénica de hueso-3, proteínamorfogénica de hueso-4, proteínamorfogénica de hueso-5, proteínamorfogénica de hueso-6, proteínamorfogénica de hueso-7, proteínamorfogénica de hueso-8, proteínamorfogénica de hueso-9, proteínamorfogénica de hueso-10, proteínamorfogénica de hueso-11, proteínamorfogénica de hueso-12, proteínamorfogénica de hueso-13, proteínamorfogénica de hueso-14, proteínamorfogénica de hueso-15, receptor de proteína morfogénica de hueso IA, proteína receptor morfogénica de hueso IB, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar, receptor del factor neutrófico ciliar, factor 1 quimiotáctico neutrófilo inducido por citoquinas, neutrófilo inducido por citoquinas, factor quimiotáctico 2, factor quimiotáctico neutrófilo inducido por citoquinas 2, factor de crecimiento de células endoteliales, endotelial 1, factor de crecimiento epidérmico, atrayente de neutrófilos derivado del epitelio, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de fibroblastos 8b, factor de crecimiento de fibroblastos 8c, factor de crecimiento de fibroblastos 9, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor-1 del factor neutrófico derivado de la línea celular glial, receptor del factor neutrófico derivado de la línea celular glial -2, proteína, relacionada con el crecimiento, proteína relacionada con el crecimiento-1, proteína relacionada con el crecimiento-2, proteína relacionada con el crecimiento-3, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de tipo insulina I, receptor del factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de tipo insulina, proteína de unión del factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia II, receptor del factor inhibidor de leucemia-1, factor de crecimiento de los nervios, receptor del factor de crecimiento de los nervios, neurotropina-3, neurotropina, factor de crecimiento de placenta-4, factor de crecimiento de placenta 2, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena del factor A de crecimiento derivado de plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas AB, cadena del factor de crecimiento derivado de plaquetas B, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-1, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-2, factor de estimulación de del crecimiento de las células pre-B, factor de las células del tronco, receptor del factor de las células del tronco, factor de crecimiento de transformación 1, factor de crecimiento de transformación 2, factor de crecimiento de transformación 1, factor de crecimiento de transformación 1.2, factor de crecimiento de transformación 3, factor de crecimiento de transformación 5, factor de crecimiento de transformación latente 1, proteína de unión I al factor de crecimiento de transformación 1, proteína de unión II al factor de crecimiento de transformación 1, proteína de unión III al factor de crecimiento de transformación 1, receptor del factor de necrosis tumoral tipo I, receptor del factor de necrosis tumoral tipo II, receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, factor de crecimiento endotelial vascular y proteínas químéricas y fragmentos de estas biológica o inmunológicamente activos.

#### Inmunoterapia

50 En general, la inmunoterapia depende del uso de las células efectoras inmunitarias y moléculas para dirigir y destruir las células cancerosas. Los efectores inmunes pueden ser, por ejemplo, un pepticuerpo de la presente invención que reconoce algún marcador sobre la superficie de una célula diana. El pepticuerpo solo puede servir como un efecto de terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente la destrucción de las células. El pepticuerpo también puede estar conjugado con un fármaco o toxina (quimioterapia, radioisótopo, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina de la tosferina, etc.) y, de este modo, puede servir simplemente como agente diana.

Se pueden dirigir formas mutantes de Ang-2 mediante inmunoterapia con pepticuerpos o con conjugados de pepticuerpo de la invención.

Se ha demostrado que la inmunoterapia pasiva es particularmente eficaz contra una serie de cánceres. Véase, por ejemplo, WO 98/39027.

60 Con los siguientes ejemplos se pretende únicamente ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ningún modo.

## Ejemplo 1

## Expresión de Ang-2 en tejido patológico y normal

La expresión de Ang-2 se analizó en tejido normal y patológico utilizando hibridación in situ. Los fragmentos de las secuencias de Ang-2 humana (Número de acceso en Genbank: AF004327, nucleótidos 1274-1726) y murina (Número de acceso en Genbank: AF004326, nucleótidos 1135-1588) se amplificaron mediante PCR-transcriptasa inversa de ADNc de pulmón fetal humano o murino, clonadas en el plásmido pGEM-T y verificadas mediante secuenciación. Las sondas de ARN antisentido marcadas con  $^{33}\text{P}$  se transcribieron a partir de moldes de plásmidos linealizados usando  $^{33}\text{P}$ -UTP y ARN polimerasa. Los bloques de tejidos incluidos en parafina fijados con formaldehído se seccionaron a 5  $\mu\text{m}$  y se colocaron sobre portaobjetos cargados. Antes de la hibridación in situ, los tejidos se permeabilizaron con HCl 0,2M, seguido de la digestión con Proteinasa K, y acetilación con trietanolamina y anhídrido acético. Las secciones se hibridaron con la sonda marcada radioactivamente durante la noche a 55°C, después se sometieron a digestión con ARNasa y a un lavado en condiciones de alta rigurosidad en aproximadamente 0,1 X SSC a 55°C. Los portaobjetos se sumergieron en emulsión Kodak NTB2, se expusieron a 4 °C durante 2-3 semanas, se desarrollaron y se sometieron a contratinación. Las secciones se analizaron con campo oscuro e iluminación estándar para permitir la evaluación simultánea de la morfología de tejidos y señal de hibridación.

Los resultados indicaron que la expresión de Ang-2 en seres humanos nacidos normalmente, se restringe a los pocos tejidos que contienen vasculatura angiogénica, como ovarios, placenta, y útero. No se detectó expresión de Ang-2 en el corazón, cerebro, riñón, hígado, pulmón, páncreas, bazo, músculo, amígdala, timo, apéndice, ganglio linfático, vesícula biliar, próstata o testículos humanos adultos normales. En ratones de cinco meses de edad (pero no en monos o seres humanos adultos) los riñones mostraron una expresión de Ang-2 prominente en el vasa recta (vasos rectos). Para determinar si esta expresión era un remanente del desarrollo embrionario, este experimento se repitió sobre los riñones derivados de ratones de edades variables hasta un año, utilizando la sonda de Ang-2 murina y las condiciones descritas anteriormente. Se observó que la expresión de Ang-2 disminuyó durante el desarrollo neonatal, pero fue todavía más evidente en los riñones de los ratones de un año de edad.

También se detectó expresión de Ang-2 en virtualmente todos los tipos de tumor analizados, incluso los tumores humanos primarios como carcinoma de colon (5 casos), carcinoma de mama (10 casos), carcinoma de pulmón (8 casos), glioblastoma (1 caso), tumores metastáticos humanos como carcinoma de mama (2 casos), carcinoma de pulmón (2 casos) y carcinoma de ovarios (2 casos) que se han metastatizado en el cerebro, y modelos de tumores de roedores como C6 (glioma de rata), HT29 (carcinoma de colon humano), Colo-205 (carcinoma de colon humano), HCT116 (carcinoma de colon humano), A431 (carcinoma epidermoide humano), A673 (rhabdomiosarcoma humano), HT1080 (fibrosarcoma humano), PC-3 (carcinoma de próstata humano), B16F 10 (melanoma murino), MethA (sarcoma murino) y carcinoma de pulmón de Lewis. Adicionalmente, se detectó expresión de Ang-2 se detectó en vasos nuevos que crecen en un tapón de Matrigel en respuesta a VEGF y en un modelo de hipoxia en ratón de retinopatía de premadurez.

## Ejemplo 2

## Ensayos moleculares para evaluar pepticuerpos de Ang-2

Se desarrollaron ensayos moleculares (ELISA de afinidad, ELISA de neutralización y BIACore) para evaluar el enlace directo de pepticuerpo a Ang-2 y miembros de la familia relacionados, y el efecto de los pepticuerpos sobre la interacción de Ang-2:Tie-2. Estos ensayos in vitro se describen de la siguiente manera:

## ELISA de afinidad

Para la selección inicial de pepticuerpos candidatos a anti-Ang-2, se utilizaron polipéptidos de Ang-2 humano (R&D Systems, Inc; número de catálogo 623- AN; Ang-2 se proporciona en forma de una mezcla de 2 versiones truncadas) o murino purificados (preparado como se ha descrito anteriormente). Para los ensayos de unión confirmatorios, se obtuvo Ang-2 humana a partir de medios acondicionados de células 293T humanas transfectadas con ADN de Ang-2 de longitud completa y se cultivaron en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) sin suero que contiene aproximadamente 50 microgramos por ml de albúmina sérica bovina (BSA).

Mediante el uso placas de micrótiteración, se añadieron, en cada pocillo, aproximadamente 100 microlitros por pocillo de ANg-2 y las placas se incubaron durante aproximadamente 2 horas, después de lo cual las placas se lavaron cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Los pocillos se bloquearon posteriormente utilizando aproximadamente 250 microlitros por pocillo de aproximadamente 5 por ciento de BSA en PBS, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Después de la incubación, se descartó el exceso de la solución de bloqueo y aproximadamente 100 microlitros de cada candidato de pepticuerpo anti- Ang-2 se añadió a un pocillo en una serie de diluciones que comenzaron a una concentración de aproximadamente 40 nanomolar y, posteriormente, se diluyeron en serie 4 veces en PBS que contenía aproximadamente 1 por ciento de BSA. Las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron con PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween- 20. Se repitieron los lavados cuatro veces más, después de lo cual se

añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG(Fc)-HRP de cabra anti-humana (Pierce Chemical Co., nº de catálogo 31416) previamente diluida 1:5000 en PBS que contenía 1 por ciento de BSA. Las placas se incubaron durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Después de ello, las placas se lavaron cinco veces en PBS que contenía 0,1 por ciento de Tween-20, y luego se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina Sistema de Sustrato Líquido; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, número de catálogo T8665) y las placas se incubaron por aproximadamente 5 - 15 minutos hasta que se desarrolló el color azul. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a aproximadamente 370 nm.

#### ELISA de neutralización

Las placas de microtitulación a las que se ha ligado el polipéptido de Ang-2 humana se prepararon como se ha descrito para el ELISA de afinidad. Los pepticuerpos candidatos de anti-Ang-2 se titularon desde 1000 nM a 0,2 pM en 4 diluciones en una solución de PBS que contiene aproximadamente 1% de BSA y aproximadamente 1 nM de Tie-2 (suministrado en forma de molécula Tie-2-Fc, donde la parte Tie-2 contiene solamente la porción extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). A cada pocillo se le añadió aproximadamente 100 microlitros de la solución del anticuerpo/Tie-2, las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y, después, se lavaron cinco veces en PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Después del lavado, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de anticuerpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., nº de catálogo 557039) hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente 1 microgramo por ml, y las placas se incubaron durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG-HRP de cabra anti-ratón (Pierce Chemical CO., nº de catálogo 31432) a una dilución de 1:10.000 en PBS que contenía aproximadamente 1 por ciento de BSA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, después de lo cual se lavaron cinco veces con PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Posteriormente, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato TMB (descrito anteriormente) y se dejó que se desarrollara el color. Después se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a aproximadamente 370 nm.

#### 25 BIACore de afinidad

Se llevaron a cabo ensayos de unión, primero capturando aproximadamente 100 Ru de cada pepticuerpo candidato anti-Ang-2 a la proteína G inmovilizada, después de los cual se inyectaron diversas concentraciones (0-100 nM) de huAng-2 o mAng-2 sobre la superficie del anticuerpo ligado a un caudal de 50  $\mu$ l/min durante 3 minutos. Se determinaron los parámetros cinéticos de enlace a pepticuerpo incluyendo  $k_a$  (constante de velocidad de asociación),  $k_d$  (constante de velocidad de disociación) y  $K_D$  (constante de equilibrio de disociación) usando el programa informático BIA evaluation 3.1 (Biacore, Inc.). Las constantes de equilibrio de disociación menores indicaron mayor afinidad del pepticuerpo por Ang-2.

#### Ejemplo 3

##### Identificación de péptidos de unión a Ang-2

###### 35 1. Preparación de perlas magnéticas recubiertas con Ang-2

###### A. Inmovilización de Ang-2 sobre perlas magnéticas

Para la elución no específica, la proteína biotinilada Ang-2 (Angiopoietina-2 humana recombinante biotinilada, R&D Systems, Inc.; número de catálogo BT 623) se inmovilizó sobre perlas de estreptavidina (Dynal, Lake Success, NY) a una concentración de aproximadamente 4  $\mu$ g de la proteína Ang-2 biotinilada por 100  $\mu$ l de la reserva de perlas del fabricante para las tres rondas de selección. Para las eluciones de antígeno (Ang-2) y receptor (Tie-2), 2  $\mu$ g de proteína Ang-2 biotinilada se inmovilizaron sobre 50  $\mu$ l de las perlas de estreptavidina para las segundas rondas de selección. Se redujo la concentración de recubrimiento hasta aproximadamente 1  $\mu$ g de proteína Ang-2 biotinilada por 50  $\mu$ l de la reserva de perlas para la tercera ronda de selección. Al colocar las perlas a un lado de un tubo usando un imán y al retirar el líquido por pipeta, las perlas se lavaron cinco veces con la solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se volvieron a suspender en PBS. La proteína Ang-2 biotinilada se añadió a las perlas lavadas a la concentración anterior y se incubó con rotación durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una incubación de unas horas a una noche a 4 °C con rotación. Las perlas recubiertas con Ang-2 se bloquearon mediante la adición de BSA hasta aproximadamente un 1% de concentración final e incubación durante la noche a 4°C con rotación. Las perlas recubiertas con Ang-2 resultantes se lavaron cinco veces con PBS antes de someterse a los procedimientos de selección.

###### B. Preparación de perlas de selección negativa

También se prepararon perlas adicionales para las selecciones negativas. Para cada condición de cribado, 500  $\mu$ l de la reserva de perlas del fabricante se sometieron al procedimiento anterior (sección 1A), excepto que se omitió la etapa de incubación con Ang-2 biotinilada. En la última etapa de lavado, las perlas se dividieron en cinco alícuotas de 100  $\mu$ l.

###### 55 2. Selección de fago de enlace a Ang-2 A.

## A. Estrategia global

Tres genotecas de fago filamento, denominadas TN8-IX (transformantes independientes  $5 \times 10^9$ ), TN12-I (transformantes independientes  $1,4 \times 10^9$ ), y Lineal (transformantes independientes  $2,3 \times 10^9$ ) (todos de Dyax Corp.) se usaron para seleccionar el fago de enlace a Ang-2. Cada genoteca se sometió ya sea a una elución no específica, elución de Ang-2 y elución del receptor (Tie-2). Se llevaron a cabo nueve condiciones diferentes de cribado para Ang-2 (TN8-IX usando el procedimiento de elución no específico, TN8-IX usando el procedimiento de elución de Ang-2, TN8-IX usando el procedimiento de elución de Tie-2, TN12-I usando el procedimiento de elución no específico, TN12-I usando el procedimiento de elución de Ang-2, y TN12-I usando el procedimiento de elución de Tie-2, Lineal usando el procedimiento de elución no específico de Ang-2, y Lineal usando el procedimiento de elución de Tie-2). Para las tres genotecas, el fago de la primera ronda de selección se eluyó solamente de una manera no específica para las posteriores rondas de selección. Las eluciones de Ang-2 y Tie-2 se usaron en la segunda y tercera rondas de selección. Para la genoteca Lineal, la selección se llevó a cabo hasta solamente la segunda ronda para las eluciones de Ang-2 y Tie-2.

## B. Selección negativa

Para cada condición de cribado, aproximadamente 100 genotecas aleatorias equivalentes para las genotecas TN8-IX y TN12-1 (aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  pfu para TN8-IX, y aproximadamente  $1,4 \times 10^{11}$  pfu para TN12-1) y aproximadamente 10 genotecas aleatorias equivalentes para la genoteca lineal (aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  pfu) se aliquotaron de la reserva de genotecas y se diluyeron a aproximadamente 400  $\mu$ l con PBST (PBS con 0,05% de Tween-20). Después del último lavado, se extrajo el líquido de la primera alícuota de 100  $\mu$ l de las perlas preparadas para la selección negativa (sección 1 B), la reserva de genoteca diluida de 400  $\mu$ l se añadió a las perlas. La mezcla resultante se incubó durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente con rotación. El sobrenadante del fago se extrajo usando el imán y se añadió a la segunda alícuota de 100  $\mu$ l para otra etapa de selección negativa. De esta forma, se realizaron cinco etapas de selección negativa.

## C. Selección usando las perlas recubiertas con proteína Ang-2

El sobrenadante de fago, después la última etapa de selección negativa (sección 1 B) se añadió a las perlas recubiertas con Ang-2 (sección 1 A). Esta mezcla se incubó con rotación durante una a dos horas a temperatura ambiente, permitiendo que el fago se uniera a la proteína diana. Después de desechar el sobrenadante, las perlas se lavaron aproximadamente diez veces con PBST, seguido de dos lavados con PBS.

## D. Elución no específica

Después del lavado final, se extrajo el líquido (sección 2C), se añadió aproximadamente 1 ml de solución de sales Min A (60 mM de K2HPO4, 33 mM de KH2PO4, 7,6 mM de (NH4)SO4, y 1,7 mM de citrato sódico) a las perlas. Esta mezcla de perlas se añadió directamente a una muestra de bacterias concentrada para infección (véase más adelante las secciones 3A y 3B).

## E. Elución del antígeno (Ang-2) del fago unido

Para la ronda 2, después de la última etapa de lavado (sección 2C), el fago unido se eluyó de las perlas magnéticas mediante la adición de 100  $\mu$ l de 1 pM, 0,1 nM, y 10 nM de proteína recombinante Ang-2 (angiotropina-2 humana recombinante, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) sucesivamente con una incubación de 30 minutos para cada condición. El fago restante se eluyó de forma no específica (sección 2D). Se combinaron el fago eluido de 10 nM y las eluciones no específicas y se sometieron a la tercera ronda de selección (véase la Sección 4, más adelante).

Para la ronda 3, después de la última etapa de lavado (sección 2C), el fago unido se eluyó de las perlas magnéticas mediante la adición de aproximadamente 1 nM de proteína Ang-2 recombinante y 10 nM de proteína Ang-2 recombinante sucesivamente con una incubación por 30 minutos para cada condición. Además, el fago se eluyó con 1 ml de solución de trietilamina 100 mM (Sigma, St. Louis, Missouri) durante aproximadamente 10 minutos en un rotador. El pH del fago que contiene la solución de trietilamina se neutralizó con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M (pH 7,5). Después de la última elución con solución de trietilamina 100 mM, el fago restante se eluyó mediante la adición de perlas a las bacterias (sección 2D).

## F. Elución del receptor (Tie-2) de fago unido

Para la ronda 2, después de la última etapa de lavado (sección 2C), el fago unido se eluyó de las perlas magnéticas mediante la adición de aproximadamente 100  $\mu$ l de 1 pM, 0,1 nM y 10 nM de proteína Tie-2 (quimera Tie2-Fc recombinante, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) sucesivamente con una incubación de 30 minutos para cada condición. El fago restante se eluyó de forma no específica (sección 2D). Se combinaron el fago eluido de 10 nM y las eluciones no específicas y se sometieron a la tercera ronda de selección (véase la Sección 4, más adelante).

Para la ronda 3, después de la última etapa de lavado (sección 2C), el fago unido se eluyó de las perlas magnéticas

mediante la adición de aproximadamente 1 nM de proteína Ang-2 recombinante y 10 nM de proteína Tie-2 recombinante sucesivamente con una incubación de 30 minutos para cada condición. Además, el fago se eluyó con 1 ml de 100 mM de solución de trietilamina (Sigma, St. Louis, Missouri) durante 10 minutos en un rotador. El pH del fago que contiene la solución de trietilamina se neutralizó con 0,5 ml de 1M de Tris-HCl (pH 7,5). Después de la 5 última elución con 100 mM de solución de trietilamina, el fago restante se eluyó mediante la adición de perlas a las bacterias (sección 2D).

### 3. Amplificación

#### A. Preparación de células de placa

10 Se cultivó *E. coli* nuevo (XL-1 Blue MRF') hasta OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0,5 en medios LB que contenían aproximadamente 12,5 ug/ml de tetraciclina. Para cada condición de cribado aproximadamente 20 ml de este cultivo se enfriaron en hielo y se centrifugaron. Se resuspendió el gránulo de bacterias en aproximadamente 1 ml de la disolución de sales min A.

#### B. Transducción

15 A una muestra concentrada de bacterias (sección 3A) se añadió cada mezcla de cada procedimiento diferente de elución indicado anteriormente (secciones 2D, 2E y 2F) y se incubó a 37°C durante aproximadamente 15 minutos. A cada mezcla se añadieron aproximadamente 2 ml de medio NZCYM (2XNZCYM, 50 µg/ml de ampicilina) y se incubó a 37°C durante 15 minutos. La solución resultante de 4 ml se colocó en una placa grande de agar NZCYM que contenía aproximadamente 50 µg/ml de ampicilina y se incubó durante la noche a 37°C.

#### C. Recolección de Fagos

20 Cada mezcla de bacterias/fago se cultivó durante la noche en una placa grande de agar NZCYM (sección 3B), después de lo cual se retiraron por raspado en aproximadamente 35 ml de medio LB. La placa de agar se aclaró con 35 ml adicionales de medio LB. La mezcla resultante de bacterias/fago en el medio LB se centrifugó para que separar las bacterias en forma de gránulos. Aproximadamente 50 ml del sobrenadante del fago se transfirieron a un tubo nuevo y aproximadamente 12,5 ml de solución de PEG (20% de PEG8000, 3,5M de acetato amónico) se añadieron y se incubaron en hielo durante 2 horas para precipitar el fago. El fago precipitado se centrifugó y se volvió a suspender en 6 ml de tampón de resuspensión de fago (250 mM de NaCl, 100 mM de Tris, pH 8, 1 mM de EDTA). Esta solución de fago se purificó posteriormente mediante separación por centrifugación de las bacterias restantes y precipitación del fago por segunda vez mediante la adición de aproximadamente 1,5 ml de solución PEG. 25 Después de una etapa de centrifugación, el sedimento de fago se volvió a suspender en aproximadamente 400 µl de PBS. Esta solución se sometió a una centrifugación final para retirar la solución de cualquier desecho de bacterias restante. La preparación de fago resultante se tituló usando ensayos de formación de placas convencionales.

#### 4. Selección y Amplificación adicional

35 En la segunda ronda, la preparación de fago amplificado (aproximadamente 1010 pfu) de la primera ronda (sección 3C) se utilizó como el fago de entrada para realizar las etapas de selección y amplificación (secciones 2 y 3). Para las eluciones de Ang-2 y Tie-2, el fago de eluciones de 10 nM y no específicas se combinaron y se amplificaron para la tercera ronda de selección. La preparación de fago amplificado (aproximadamente 109 pfu) de la segunda ronda se utilizó como el fago de entrada para realizar la tercera ronda de selección y amplificación (secciones 2 y 3). 40 Después de las etapas de elución (secciones 2D, 2E, y 2F) de la tercera ronda, una pequeña fracción del fago eluido se colocó en placas como en el ensayo de formación de placas (sección 3C). Las placas individuales se escogieron y se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían 100 µl de tampón TE en cada pocillo. Estas placas maestras se incubaron a 4°C durante la noche para permitir que el fago se eluyera en el tampón de TE.

#### 5. Análisis clonal

Los clones de fago se analizaron mediante ELISA de fago y secuenciación de ADN. Las secuencias se clasificaron basándose en los resultados combinados de estos dos ensayos.

#### 45 A. ELISA del fago

Se desarrolló un cultivo de An XL-1 Blue MRF" hasta que la OD600 alcanzó aproximadamente 0,5. Aproximadamente treinta µl de este cultivo se depositaron en muestras alícuotas en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Aproximadamente 10 µl del fago eluido (sección 4) se añadieron a cada pocillo y se dejó que infectaran las bacterias durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Aproximadamente 50 100 µl de medio LB que contenía aproximadamente 12,5 µg/ml de tetraciclina y aproximadamente 50 µg/ml de ampicilina se añadieron a cada pocillo. Posteriormente, la placa de microtitulación se incubó con agitación durante toda la noche a aproximadamente 37°C. La Proteína Ang-2 recombinante (aproximadamente 1 µg/ml en PBS) se dejó que se uniera a las placas Maxisorp de 96 pocillos (NUNC) durante la noche a aproximadamente 4°C. Como control, estreptavidina pura se revistió sobre una placa Maxisorp separada a aproximadamente 2 µg/ml en PBS.

Al día siguiente, el líquido en las placas Maxisorp revestidas con proteína se desechó, y cada pocillo se bloqueó con aproximadamente 300  $\mu$ l de un 5% de solución láctea a aproximadamente 4°C durante toda la noche (como alternativa, 1 hora a temperatura ambiente). Posteriormente, la solución láctea se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con la solución de PBST. Después de la última etapa de lavado, se añadieron aproximadamente 50  $\mu$ l de

- 5 PBST-4% de leche a cada pocillo de las placas Maxisorp revestidas con proteína. Aproximadamente 50  $\mu$ l de los cultivos de la noche de cada pocillo en la placa de microtitulación de 96 pocillos se transfirieron a los pocillos correspondientes de las placas revestidas con Ang-2 así como a las placas revestidas con estreptavidina control. La mezcla de 100  $\mu$ l en cada tipo de placa se incubó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. El líquido se desechó de las placas de Maxisorp y los pocillos se lavaron aproximadamente tres veces con PBST. El 10 anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) se diluyó hasta aproximadamente 1:7.500, y aproximadamente 100  $\mu$ l de la solución diluida se añadió a cada pocillo de las placas Maxisorp durante aproximadamente 1 hora de incubación a temperatura ambiente. El líquido se desechó nuevamente y los pocillos se lavaron aproximadamente cinco veces con PBST. Posteriormente, aproximadamente 100  $\mu$ l del sustrato TMB (Sigma) se añadieron a cada pocillo y se detuvo la reacción con aproximadamente 50  $\mu$ l de la solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N. 15 La OD<sub>450</sub> se leyó sobre un espectrofotómetro (Molecular Devices).

#### B. Secuenciación de los clones de fago

Para cada clon de fago, se preparó el molde de secuenciación usando PCR. Se usó el siguiente par de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de aproximadamente 500 nucleótidos:

Cebador 1: 5'-CGCGCGCAACTATCGGTATCAAGCTG-3' (SEQ ID NO: 54)

20 Cebador 2: 5'-CATGTACCGTAAACACTGAGTTTCGTC-3' (SEQ ID NO:55)

Se preparó la siguiente mezcla para cada clon:

Reactivos	Volumen ( $\mu$ L) /Tubo
d H <sub>2</sub> O	26,25
50% de glicerol	10
10X tampón de PCR (sin MgCl <sub>2</sub> )	5
25 mM de MgCl <sub>2</sub>	4
10 mM de mezcla de dNTP	1
100 $\mu$ M de cebador 1	0,25
100 $\mu$ M de cebador 2	0,25
Taq polimerasa	0,25
Fago en TE (art. 4)	3
Volumen de la reacción final	50

Para PCR, se usó un termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) para llevar a cabo el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos; (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 seg) x 30 ciclos; 72°C durante 7 minutos; enfriamiento hasta 4°C. El producto de PCR de cada reacción se purificó utilizando el kit de purificación QIAquick Multiwell PCR (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. El producto purificado de PCR se analizó posteriormente mediante el desarrollo de aproximadamente 10  $\mu$ l de cada mezcla de reacción de PCR con aproximadamente 1  $\mu$ l de pigmento (10 X BBXS de pigmento de carga de gel de agarosa) sobre un gel de agarosa al 1%. El producto restante se secuenció utilizando el secuenciador ABI 377 (Perkin Elmer) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

#### 30 6. Clasificación de secuencias y determinación de la secuencia consenso

##### A. Clasificación y análisis de secuencias

Las secuencias de péptidos que se tradujeron de secuencias de nucleótidos variables (sección 5B) se correlacionaron con los datos de ELISA. Los clones que mostraban OD<sub>450</sub> alta en los pocillos revestidos con Ang-2 y

- 35 OD<sub>450</sub> baja en los pocillos revestidos con estreptavidina proporcionaron una clasificación de prioridad más elevada. A las secuencias que aparecieron múltiples veces también se les asignó una clasificación de prioridad alta. Las secuencias candidatas se eligieron basándose en estos criterios para el análisis adicional como péptidos o pepticuerpos.

## B. Determinación de la secuencia consenso

Se generaron tres clases diferentes de motivos consenso a partir la genoteca de TN8-IX del siguiente modo

KRPCEEXWGGCXYX (SEQ ID NO:56)

KRPCEEXFGGCXYX (SEQ ID NO:57)

XXXCXDXYWYCXXX (SEQ ID NO:61)

XXXCXDXYTYCXXX (SEQ ID NO:62)

XXXCXDXFWYCXXX (SEQ ID NO:63)

XXXCXDXFTYCXXX (SEQ ID NO:64)

XXXCXWDPWTCEXM (SEQ ID NO:58)

- 5 Se generó un motivo consenso a partir de la genoteca TN12-I:

WSXCAWFNXGXXXXCRRX (SEQ ID NO:59)

Para todas las secuencias motivo consenso, las secuencias de aminoácidos centrales subrayadas de cada secuencia consenso se obtuvieron mediante la determinación del aminoácido más frecuente en cada posición. X se refiere a cualquier aminoácido de origen natural. Las dos cisteínas adyacentes a las secuencias centrales eran aminoácidos fijos en las genotécas TN8-IX y TN12-I.

10 Los péptidos que se identificaron como vinculantes a Ang-2 se exponen en la Tabla 3 a continuación.

**Tabla 3: Péptidos de unión a Ang-2**

Péptido	Seq Id No.	Secuencia
TN8-8	1	KRPCEEMWGGCNYD
TN8-14	2	HQICKWDPWTCKHW
TN8-Con1	3	KRPCEEIFGGCTYQ
TN8-Con4	4	QEECEWDPWTCEHM
TN 12-9	5	FDYCEGVEDPFIFGCDNH
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFIFQQ
C17	7	QYGCDGFLYGCMin

Ejemplo 4

Construcción de pepticuerpos que codifican ADN

- 15 Los péptidos modificados seleccionados como potencialmente inhibidores del enlace de Ang-2:Tie-2 (véase la Tabla 3) se utilizaron para construir proteínas de fusión donde un monómero de cada péptido o un dímero tandem de cada péptido (con un enlazador entre las unidades monoméricas) se condensó en marco al ADN que codifica un enlazador seguido de la región de Fc de la IgG1 humana. Cada péptido modificado se construyó mediante pares de hibridación de oligonucleótidos (oligos) para generar un polinucleótido dúplex que codifica el péptido junto con un enlazador comprendido, en función del péptido, por cinco residuos de glicina, ocho residuos de glicina o un residuo de lisina; estas construcciones se generaron como fragmentos de NdeI a Xhol. Estas moléculas de polinucleótidos dúplex se ligaron al vector (pAMG21-Fc N-terminal, descrito más adelante) que contiene el gen de Fc humano, que se había digerido previamente con NdeI y Xhol. Las mezclas de unión resultantes se transformaron mediante electroporación en las células de la cepa de *E. coli* 2596 (GM221, descritas además más adelante) utilizando procedimientos convencionales. Los clones se seleccionaron por la capacidad de producir el producto de proteína recombinante y de poseer la fusión de gen que tiene una secuencia de nucleótidos correcta. Se seleccionó uno solo de estos clones para cada uno de los péptidos modificados (es decir, productos de fusión de Fc péptido).
- 20
- 25

## Construcción del vector N-terminal de pAMG21

## pAMG21

El plásmido de expresión pAMG21 (nº ATCC 98113) deriva del vector de expresión pCFM1656 (nº ATCC 69576) y el sistema del vector de expresión descrito en la patente de los EE.UU. No. 4,710,473, siguiendo el procedimiento descrito en la solicitud de patente internacional publicada WO 00124782 (véase la parte del Ejemplo 2 que se extiende desde las páginas 100 -103, así como las figuras 17A y 17B).

## Vector N-terminal Fc

El vector N-terminal de Fc se creó utilizando la cepa de E. coli 3788, pAMG21 monómero de Tpo Gly5-Fc como molde. La información sobre la clonación de esta cepa se puede encontrar en el documento WO 00124782 (véase el Ejemplo 2 y la figura 10). Se diseñó un cebador 5' PCR (descrito más adelante) para retirar la secuencia de péptidos de Tpo en pAMG Tpo Gly5 y se reemplazó con un polienlazador que contiene los sitios ApaLI y Xhol. Mediante el uso de la cepa 3788 como molde, se realizó la PCR con la Polimerasa de Larga Expansión, utilizando el oligonucleótido de la SEQ ID NO 8, más adelante, como el cebador 5' y un cebador 3' universal, SEQ ID NO 9, más adelante. El producto de PCR resultante se purificó en gel y se sometió a digestión con las enzimas de restricción Ndel y BsrGI. Tanto el plásmido como el polinucleótido que codifican el péptido de interés junto con su enlazador se purificaron en gel usando columnas de centrifugación y purificación en gel Qiagen (Chatsworth, CA). El plásmido y el inserto se ligaron posteriormente a través de procedimientos de unión convencionales, y la mezcla de ligamiento resultante se transformó en células de E. coli (cepa 2596). Se seleccionaron clones únicos y se realizó la secuenciación de ADN. Se identificó un clon correcto y éste se usó como una fuente de vector para los péptidos modificados descritos en la presente.

Cebador 5':

**ACAAACAAACATATGGGTGCACAGAAAGCGGCCGCAAAAAAAA  
CTCGAGGGTGGAGGCCGTGGGGACA (SEQ ID NO: 8)**

Cebador 3':

**GGTCATTACTGGACCAGGATC (SEQ ID NO: 9)**

Además de la preparación de estos péptidos modificados como fusiones N-terminales a Fc (pepticuerpos N-terminales), algunos de ellos también se prepararon como productos de fusión C-terminales (pepticuerpos C-terminales). El vector usado para preparar las fusiones C-terminales se describe más adelante.

## Construcción del vector C-terminal de Fc

El vector C-terminal de Fc para péptidos modificados se creó utilizando la cepa de E. coli 3728, pAMG21 monómero de Tpo Gly5-Fc como molde. La información sobre la clonación de esta cepa se puede encontrar en el documento WO 0024782 (véase el Ejemplo 2 y la figura 7 en la presente). Se diseñó un cebador 3' para PCR (SEQ ID NO 10) para retirar la secuencia de péptidos de Tpo y para reemplazarla con un polienlazador que contiene los sitios ApaLI y Xhol. Mediante el uso de la cepa 3728 como molde, se realizó la PCR con la Polimerasa de Larga Expansión, usando un cebador universal en 5 (SEQ ID NO 11) y el cebador en 3 mencionado anteriormente. El producto de PCR resultante se purificó en gel y se sometió a digestión con las enzimas de restricción BsrGI y BamHI. Tanto el plásmido como el polinucleótido que codifica cada péptido de interés con su enlazador se purificaron en gel usando columnas de centrifugación y de purificación en gel. El plásmido y el inserto se ligaron posteriormente utilizando procedimientos de unión convencionales, y la mezcla de ligamiento resultante se transformó en células de E. coli (cepa 2596). Se seleccionaron clones únicos y se realizó la secuenciación de ADN. Se identificó un clon correcto y se usó como una fuente de vector para los péptidos modificados descritos en la presente.

Cebador 5':

**CGTACAGGTTACGCAAGAAAATGG (SEQ ID NO: 10) P**

Cebador 3':

**TTTGTGGAATCCATTACTCGAGTTTTGCGGCCGCTTCTGTG  
CACCACCACTCCACCTTAC (SEQ ID NO: 11)**

**GM221 (#2596).** La cepa receptora nº 2596, utilizada para expresar las proteínas de fusión del péptido-Fc, es una cepa de E. coli K-12 modificada para contener el promotor de lux, y tanto el represor lambda sensible a la temperatura c1857s7 en la región temprana ebg como el represor lacI<sup>d</sup> en la región tardía ebg. La presencia de estos dos genes represores permite el uso de este receptor con una variedad de sistemas de expresión. La denominación de ATCC para esta cepa es 202174.

## Ejemplo 5

## Producción de pepticuerpos

Expresión en *E. coli*. Se cultivaron cada una de las construcciones de fusión pAMG21-Fc en *E.Coli* GM221 a 37°C en el medio Terrific Broth (véase Tartof and Hobbs, Improved media for growing plasmid and cosmid clones, Bethesda Research Labs Focus, volumen 9, página 12, 1987, citado en la referencia de Sambrook et al. mencionada anteriormente).

5 Se logró la inducción de la expresión de producto génico a partir del promotor luxPR tras la adición del autoinductor sintético, N-(3-oxohexanoil)-DL-homoserina lactona, al medio de cultivo hasta lograr una concentración final de 20 nanogramos por millilitro (ng/ml). Los cultivos incubaron a 37 °C durante 6 horas adicionales. Después se analizaron los cultivos bacterianos mediante microscopía para determinar la presencia de 10 cuerpos de inclusión y se recogieron mediante centrifugación. Se observaron cuerpos de inclusión refráctiles en los cultivos inducidos, lo que indicó que las fusiones de Fc se producían probablemente, en la fracción insoluble en *E. coli*. Se lisaron los sedimentos celulares directamente mediante la resuspensión en tampón de muestra Laemmli que contenía β-mercaptoetanol al 10% y se analizaron mediante SDS-PAGE. En la mayoría de los casos, se observó una banda intensa teñida con coomassie apropiado en un gel SDS-PAGE.

15 Purificación. Las células se quebraron en agua (1/10) utilizando homogeneización de alta presión (dos pasos a 14.000 PSI) y se recogieron los cuerpos de inclusión mediante centrifugación (4000 RPM en centrifugadora J-6B durante una hora). Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en guanidina 6 M, 50 mM de Tris, 8 mM de DTT, pH 8,5 durante 1 hora a una proporción 1/10. Para los péptidos lineales fusionados con Fc, la mezcla solubilizada se diluyó veinticinco veces en urea 2 M, 50 mM de Tris, 160 mM de arginina, 2 mM de cisteína, pH 8,5. Se dejó que la 20 oxidación proceda durante dos días a 4°C, permitiendo la formación del compuesto unido a disulfuro (es decir, homodímero Fc-péptido). Para los péptidos cílicos fusionados con Fc, se siguió este mismo protocolo además de las siguientes tres condiciones de plegamiento: (1) urea 2 M, 50 mM de Tris, 160 mM de arginina, 4 mM de cisteína, 1mM de cistamina, pH 8.5; (2) urea 4 M, glicerol al 20 %, 50 mM de Tris, 160 mM de arginina, 2 mM de cisteína, pH 8.5; y (3) urea 4 M, glicerol al 20 %, 50 mM de Tris, 160 mM de arginina, 4 mM de cisteína, 1mM de cistamina, pH 25 8.5. La proteína replegada se dializó contra urea 1,5M, 50mM de NaCl, 50mM de Tris, pH 9,0. El pH de la mezcla se redujo a un pH de 5 con ácido acético. Se retiró el precipitado mediante centrifugación y el sobrenadante se ajustó hasta un pH de entre 5 y 6.5, en función del punto isoeléctrico de cada producto de fusión. La proteína se filtró y se 30 cargó a 4 °C en una columna de SP-Sefarosa HP equilibrada en 20 mM de NaAc, 50 mM de NaCl al pH determinado para cada construcción. La proteína se eluyó usando un gradiente lineal de volumen de 20 columnas en el mismo tampón que varía entre 50 mM de NaCl y 500 mM de NaCl. El pico se combinó y se filtró.

Los pepticuerpos generados mediante los procedimientos anteriores se exponen en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

Pepticuerpo	Secuencia de pepticuerpos
L1 (N)	MGAQKFNPLDEEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:12)
L1 (N) WT	MKPNPLDEEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:13)
L1 (N) 1K WT	MKFNPLDEEETLYEQFTFQQSGSATGGSGTASSGSGSATHLEGGGG-Fc (SEQ ID NO:14)
2xL1 (N)	MGAQKFNPLDEEETLYEQFTFQQGGGGGGKFNPLDEEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:15)
2xL1 (N) WT	MKFNPLDEEETLYEQFTFQQGGGGGGKFNPLDEEETLYEQFTFQLLEGGGG-Fc (SEQ ID NO:16)
Con4 (N)	MGAQQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:17)
Con4 (N)1 K-WT	MEQEECEWDPWTCEHMGSATGGSGTASSGSGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:18)
2xCon4 (N) 1 K	MGAQQEECEWDPWTCEHMGSATGGSGTASSGSGSATHQEECEWDWTCEHMLEGGGG-Fc (SEQ ID NO:19)
L1 (C)	M-Fc-GGGGGAQKFNPLDEEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:20)
L1 (C) 1K	M-Fc-GGGGGAQGSGSATGGSGTASSGSGSATHKFNPLDEEETLYEQFTFQQL (SEQ ID NO:21)

Pepticuerpo	Secuencia de pepticuerpos
2xL1 (C)	M-Fc- GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTQQLE (SEQ ID NO:22)
Con4 (C)	"M-Fc-GGGGQAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:23)
Con4 (C) 1 K	M-Fc- GGGGGAQGSGSATGGSGSRASSGSGSATQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:24)
2xCon4 (C) 1 K	M-Fc- GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMGSATGGSGSTASSGSGSATQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:25)
Con4-L1 (N)	MGAQEECEWDPWTCEHMGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGSGSATLEGFFFF-Fc (SEQ ID NO:26)
Con4-L1 (C)	M-Fc- GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATKFNPLDELEETLYEQFTFQGGGGQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:27)
TN-12-9 (N)	MGAQ-FDYCEGVEDPFTFGCDNHLE-GGGG-Fc (SEQ ID NO:28)
C17 (N)	MGAQ-QYGCDFLYGCMINLE-GGGG-Fc (SEQ ID NO:29)
TN8-8 (N)	MGAQ-KRPCEEMWGGCNYDLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:30)
TN8-14 (N)	MGAQ-HQICKWDPWTCKHWLEGFFFF-Fc (SEQ ID NO:31)
Con1 (N)	MGAQ-KRPCEEIFGGCTYQLEGFFFF-Fc (SEQ ID NO:32)

En la Tabla 4, Fc se refiere a la secuencia de Fc IgG1. La columna dos expone la secuencia de aminoácidos del pepticuerpo. Su parte Fc está marcada Fc, y se expone en la SEQ ID NO 60, a continuación. Se apreciará que cuando se utiliza una marca, por ejemplo, "Con4" o "Con-4", esta se refiere al péptido Con-4, mientras que el uso del sufijo "C", "(C)", o "-C"; o "N", "(N)", o "-N" indica que la molécula es un pepticuerpo como se describe en la presente.

5 Los sufijos N, (N), o -N en un nombre de pepticuerpo indican que el péptido de unión a Ang-2 (o péptidos) está/están en N-terminal al dominio Fc, y los sufijos C, (C) o -C indican que el péptido de unión a Ang-2 (o péptidos) está/están en C-terminal con el dominio Fc. Además, 2xCon4 (C) 1 K, como se define en la SEQ ID NO 25, también se puede nombrar sin el sufijo 1 K en la presente.

10 La secuencia de aminoácidos de la porción Fc de cada pepticuerpo es (desde el terminal amino al terminal carboxilo):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPPDKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVL  
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
 LSPGK (SEQ ID NO: 60)

La secuencia de ADN (SEQ ID NO 33-53) que codifica los pepticuerpos que corresponden al pepticuerpo de SEQ ID NO 12 - 32, respectivamente, en la Tabla 4) se expone a continuación:

SEQ ID NO:33

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCT  
 GTACGAACAGTCACITTCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCAGGTGGGG  
 ACAAACACTCACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTGGGG  
 GACCGTCAGTTCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCATGAT  
 CTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGA  
 AGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC  
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC  
 CGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGC  
 AAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATC  
 GAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACCAGGT  
 GTACACCCCTGCCCTATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGT  
 CCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGA  
 GTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAACGCC  
 CCGTGTGGACTCCGACGGCTCTCTCCTACAGCAAGCTACCGT  
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCATGCTCCGTGAT  
 GCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGT  
 TCCGGTAAATAATGGATCC

SEQ ID NO:34

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCTGTACGAACA  
 GTTCACITTCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCAGGTGGGGACAAA  
 ACTCA  
 CACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTGGGGGGACCGTCAGT  
 TTCTCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCATGATCTCCGGACC  
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA  
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTACA  
 GACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA  
 GCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA  
 AGTCAAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAA  
 ACCA  
 TCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACCACAGGT  
 GTACACCCCT  
 CCCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGAGTCAGCCTGACCTGC  
 CTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGC  
 AATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAAGCCTCCGTGCTGGA  
 CTCCGACGGCTCTCTCCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAG  
 CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC  
 TCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAA  
 ATAA

5 SEQ ID NO:35

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCTGTACGAACA  
 GTTCACITTCAGCAGGGATCCGGTCTGCTACTGGTGGTCCGGCTCC  
 ACCGCAAGCTCTGGTCAAGGCACTGCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGC  
 GGTGGGGACAAA  
 ACTCACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCT  
 CTGGGGGGACCGTCAGTTCTCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACC  
 CTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTG  
 AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT  
 GGAGGGCATAATGCCAAGAACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA  
 GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGC  
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCA  
 GCCCCATCGAGAAA  
 ACCACAGGTGTACACCCCTGCCCTATCCCAGGAGTGGAGCTGACCAAGAA  
 CCAGGTCACTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACAT  
 CGCCGTGGAGTGGGAGGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGA  
 CCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTACAGCAA  
 GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCAT  
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCC  
 TCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

SEC ID NO:36

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCT  
 GTACGAACAGTTCACTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGG  
 TAAGTTCAACCCACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTT  
 CACTTCCAGCAACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTACA  
 CATGTCCACCTTGGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTT  
 TCCTCTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCC  
 CTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG  
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG  
 ACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG  
 CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA  
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT  
 CTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACCACAGGTGTACACCCTGC  
 CCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAACCTGACCTGCC  
 TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA  
 ATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGAACACGCCCTCCCGTGTGGAC  
 TCCGACGGCTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC  
 AGGTGGCAGCAGGGGAAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT  
 CTGCACAACCACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA  
 TAA

SEQ ID NO:37

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCTGTACGAACA  
 GTTCACTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCC  
 ACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTCCAGCA  
 ACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTT  
 GCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTTTCCTCTCCCCC  
 AAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCAATG  
 CGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTG  
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAACAAAGCCGGGG  
 AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCC  
 TGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC  
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAA  
 AGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCAGGG  
 ATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAACCTGACCTGCCGTCAAAGGCT  
 TCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCG  
 GAGAACAACTACAAGAACACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCC  
 TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG  
 GGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
 TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

5 SEQ ID NO:38

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCAATGGACCCATGGACTTGC  
 ACACATGCTGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC  
 CACCTGCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTTTCCTCT  
 CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT  
 CACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT  
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAACAGC  
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC  
 ACCGTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC  
 GGTCTCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAA  
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACACAGGTGTACACCCTGCCCAT  
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACACAGGTCAACCTGACCTGCCGTGG  
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGG  
 CAGCCGGAGAACAACTACAAGAACACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGAC  
 GGCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG  
 CAGCAGGGAAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC  
 AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

SEQ ID NO:39

ATGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCACACATGGG  
 ATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCA  
 GGCAGTGCAGACTCATCTGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCA  
 CACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGT  
 TTCTCTCTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCGGACC  
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA  
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA  
 GACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA  
 GCGTCCCTCACCGCCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA  
 AGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA  
 TCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTG  
 CCCCCATCCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTTCAGCCTGACCTGC  
 CTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGC  
 AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGA  
 CTCCGACGGCTCTTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG  
 CAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGC  
 TCTGCACAAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAA  
 ATAA

SEC ID NO:40

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCAC  
 ACACATGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAG  
 CTCTGGTTCAAGGCAGTGCAGCTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCC  
 ATGGACTTGCAGACATGCTGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAA  
 CTCACACATGTCACCTTGCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGT  
 CAGTTTCTCTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCG  
 GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC  
 CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG  
 CCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG  
 GTCAGCGTCCCTCACCGCCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG  
 TACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAA  
 ACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACAC  
 CCTGCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTTCAGCCTGAC  
 CTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGA  
 GAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGC  
 TGGACTCCGACGGCTCTTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA  
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCATGCTCCGTATGCATG  
 AGGCTCTGCACAAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
 GTAAATAA

5 SEQ ID NO:41

ATGGACAAAACACATGTCACCTTGCACCGCACCTGAACCTCTGG  
 GGGGACCGTCAGTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC  
 ATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC  
 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG  
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA  
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGA  
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC  
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAAC  
 ACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA  
 GGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATCGC  
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCA  
 CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCCTACAGCAAGCT  
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCTCATGCTC  
 CGTGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC  
 CCTGTCTCCGGGTAAGGTGGAGGTGGTGTGCACAGAAATTCAACCC  
 GCTGGACGAGCTGGAAAGAGACTCTGTACGAACAGTTACTTTCAACA  
 GCTCGAGTAA

SEQ ID NO:42

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG  
 GGGGGACCGTCAGTTTCCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC  
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC  
 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA  
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCA  
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA  
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC  
 CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCC  
 ACAGGTGTACACCCGCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA  
 GGTACGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGC  
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA  
 CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGCT  
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCATGCTC  
 CGTGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC  
 CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGATCCGGTTC  
 TGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTCAAGGCAGTGC  
 GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCTGTACGA  
 ACAGTTCACTTCCAGCAACTCGAGTAA

SEQ ID NO:43

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG  
 GGGGGACCGTCAGTTTCCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC  
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC  
 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA  
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCA  
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA  
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC  
 CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCC  
 ACAGGTGTACACCCGCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA  
 GGTACGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGC  
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA  
 CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGCT  
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCATGCTC  
 CGTGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC  
 CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC  
 GCTGGACGAACCTGGAAGAAACTCTGTACGAACAGTTCACTTCCAGCA  
 GGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTCAACCCACTGGATGAGCT  
 GGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTCCAGCAACTCGAGTAA

5 SEC ID NO:44

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG  
 GGGGGACCGTCAGTTTCCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC  
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC  
 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA  
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCA  
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA  
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC  
 CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCC  
 ACAGGTGTACACCCGCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA  
 GGTACGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGC  
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA  
 CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGCT  
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCATGCTC  
 CGTGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC  
 CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAACCC  
 GCGAATGGGACCCATGGACTTGCAGACATGCTCGAGTAA

SEC ID NO:45

ATGGACAAAACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG  
GGGGGACCGTCAGTTTCCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC  
ATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC  
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG  
GGTGCATAATGCCAACAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA  
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA  
ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCCAGCC  
CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCC  
ACAGGTGTACACCCTGCCCTGATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCA  
GGTCAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGC  
CGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA  
CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCT  
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTC  
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC  
CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC  
TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC  
GACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCACACACA  
TGCTCGAGTAA

SEC ID NO:46

ATGGACAAAACACATGTCCACCTGCCAGCACCTGAACCTCTG  
GGGGGACCGTCAGTTTCCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC  
ATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC  
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG  
GGTGCATAATGCCAACAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA  
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA  
ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCCAGCC  
CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCC  
ACAGGTGTACACCCTGCCCTGATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCA  
GGTCAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGC  
CGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA  
CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCT  
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTC  
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTC  
CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT  
GCGAATGGGACCCATGGACTTGCACACATGGGATCCGGTCTGCTA  
CTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGCGCAGTC  
ATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCACACATGCTC  
GAGTAA

SEC ID NO:47

ATGGGTGCACAGGAAGAATGCGAATGGACCCATGGACTTGCAGACA  
 CATGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAATTCAACCCGCTGGACGA  
 ACTGGAAGAAACTCTGTACGAACAGTTCACTTCCAGCAGGGATCCGG  
 TTCTGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGT  
 GCGACTCATCTGAGGGTGGAGGGCGGTGGGAGACAAAACACACATGT  
 CCACCTTGCCTGCCAGCACCTGAACCTGGGGGGACCGTCAGTTTCCTCT  
 TCCCCCCTAAACCCAAAGGACACCCATGATCTCCGGACCCCTGAGG  
 TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGT  
 TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG  
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCCTC  
 ACCGTCCCTGCACCAGGACTGGTGAATGCCAAGGAGTACAAGTCAA  
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAA  
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCAT  
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAAGCCTGACCTGCCCTGGTCA  
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG  
 CAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC  
 GGCTCCCTCTCCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG  
 CAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC  
 AACCAACTACACGAGAACAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

SEC ID NO:48

ATGGACAAAACCTCACACATGTCACCTGCCAGCACCTGAACCTCG  
 GGGGGACCGTCAGTTTCCTCTCCCCCTAAACCCAAAGGACACCCCTC  
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG  
 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG  
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCA  
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCCAGGACTGGCTGA  
 ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCC  
 CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCC  
 ACAGGTGTACACCCCTGCCCTCCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCA  
 GGTACCGTGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCA  
 CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCCTCTCCCTACAGCAAGCT  
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTC  
 CGTATGCACTGAGGTCTGCACAAACCAACTACACGAGAACAGCCTCTC  
 CCTGTCTCCGGTAAAGGTGGAGGTGGTGTGCACAGGGATCCGGTTC  
 TGCTACTGGTGGTCCCGTCCACCGCAAGCTCTGGTCAAGGCTCTG  
 GACTCATAAAATTCAACCCGCTGGACGAACCTGGAAAGAAACTCTGTACGA  
 ACAGTTCACTTCCAGCAGGGTGGTGGCGGTGGTCAAGGAAGAACATGCCA  
 ATGGGACCCATGGACTTGCAGACATGCTCGAGTAA

5 SEC ID NO:49

ATGGGTGCACAGTCGACTACTGCGAAGGTGGAAAGACCCGTCAC  
 TTCGGTTGCGACAACCACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGACAAAAC  
 TCACACATGTCACCTGCCAGCACCTGAACCTGGGGGGACCGTC  
 AGTTTCCTCTCCCCCTAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCGG  
 ACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC  
 GAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC  
 AAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT  
 CAGCGTCTCACCGTCTGCACCCAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAGTA  
 CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC  
 CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCC  
 TGCCCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTCAAGCCTGACCT  
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGA  
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAAGCAGCCTCCGTGCTG  
 GACTCCGACGGCTCCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG  
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG  
 GCTCTGCACAACCAACTACACGAGAACAGCCTCTCCCTGTCTCCGGT  
 AAATAA

SEQ ID NO:50

ATGGGTGCACAGCAGTACGGTTGCACGGTTTCTGTACGGTTGCATG  
 ATCAACCTCGAGGGTGGAGGCAGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC  
 ACCTTGCCTCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTTC  
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTC  
 ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC  
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC  
 GCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGAGGTCAAGTTC  
 CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAG  
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA  
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCC  
 CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAA  
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGC  
 AGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGAGGACAAGAGCAGGTGG  
 CAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC  
 AACCACTACACGCAGAACAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

SEQ ID NO:51

ATGGGTGCACAGAAACGCCATGCGAAGAAATGTGGGGTGGTGC  
 ATACGACCTCGAGGGTGGAGGCAGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC  
 CACCTTGCCTCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTTC  
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT  
 CACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT  
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC  
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGAGGTCAAGTCTC  
 ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC  
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA  
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCAT  
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCA  
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGG  
 CAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGAGGACAAGAGCAGGTGG  
 CAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC  
 AACCACTACACGCAGAACAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

5 SEC ID NO:52

ATGGGTGCACAGCACCAGATCTGCAAATGGGACCGTGACCTGC  
 AACACTGGCTCGAGGGTGGAGGCAGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC  
 CACCTTGCCTCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTTC  
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT  
 CACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT  
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC  
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGAGGTCAAGTCTC  
 ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC  
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA  
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCAT  
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCA  
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGG  
 CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGAGGACAAGAGCAGGTGG  
 CAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC  
 AACCACTACACGCAGAACAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

SEC ID NO:53

ATGGGTGCACAGAAACGTCCATGCGAAGAAAATCTCGGTGGTTGCACC  
 TACCAGCTCGAGGGTGGAGGCAGTGGGGACAAACTCACACATGTCC  
 ACCTTGCCCAGCACCTGAACCTGGGGGGACCGTCAGTTTCCTCTTC  
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTC  
 ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC  
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC  
 GCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA  
 CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAG  
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA  
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCTGGTCAA  
 CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGC  
 AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTCTTCCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG  
 CAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC  
 AACCACTACACGCAGAACAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAATAA

## Ejemplo 6

## Ensayos de pepticuerpos

- 5 Catorce de los pepticuerpos se analizaron utilizando el ELISA de neutralización y tres de los pepticuerpos se analizaron utilizando el ELISA de afinidad. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Pepticuerpo	hAng-2		mAng-2		hAng-1	
	IC 50 (nM)	EC 50 (nM)	IC 50 (nM)	EC 50 (nM)	IC 50 (nM)	EC 50 (nM)
2xCon4 (C) 1 K	0,04		0,02			
Con4-L1 (C)	0,05		0,04			
Con4 (C)	0,20		0,30			
2xL1(N)	0,65		0,80			
Con4 (N)	0,85	0,03	0,72	0,07	Sin inhibición	Sin unión
2xL1 (C)	0,90		1,0			
Con4 (N) 1 K-WT			1,9			
L1 (N)	6		11		Sin inhibición	
C17(N)	9		13		Sin inhibición	
12-9 (N)	21		7,7		Sin inhibición	
Con1 (N)	26		~ 200		Sin inhibición	
8-14 (N)	45		33		Sin inhibición	
L1 (C)	65		37			
8-8 (N)	80		~ 700		Sin inhibición	
Control negativo Pepticuerpo 4883	Sin inhibición	Sin unión	Sin inhibición	Sin unión	Sin inhibición	Sin unión

La secuencia de aminoácidos del pepticuerpo 4883 control negativo es como se indica a continuación (la porción Fc está subrayada, el enlazador es GGGGG y la porción de péptido está en negrita):

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTL MISRTPEVTCVVVD  
VSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREGQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSS  
PGK-GGGGG-CTAGYHWNSDCECCRNN (SEQ ID NO: 243)

Se apreciará que con el uso de la expresión "Sin inhibición" en la presente no pretende indicar que los compuestos no tienen cualidades inhibidoras. Por el contrario, Sin inhibición como se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos que cuando se analizan usando el ELISA de neutralización en las condiciones descritas aquí muestran

5 un valor de  $IC_{50}$  mayor que 1000 nM, que es la mayor concentración a la que estos compuestos se seleccionaron. Aunque no se observaron cualidades inhibidoras significativas para las moléculas marcadas como que muestran "sin inhibición", se apreciará que las moléculas pueden, de hecho, demostrar las cualidades inhibidoras en condiciones de ensayo diferentes, o en diferentes ensayos. En una realización preferida se apreciará que la invención se refiere a pepticuerpos que tienen cualidades inhibidoras utilizando los ensayos descritos en la presente.

10 Dos de los pepticuerpos se analizaron usando el ensayo de afinidad BIACore (como se describe en el Ejemplo 2). Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Afinidades del pepticuerpo (Pb) para hAng-2 y mAng-2						
	hAng-2				mAng-2	
Pepticuerpo	KD (nM)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD(nM)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)
PbL1 (N)	3,1	$2,9 \times 10^5$	$9,1 \times 10^{-4}$	0,42	$5,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$
Con4 (N)	0,67	$3,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-4}$	0,60	$7,3 \times 10^5$	$4,4 \times 10^{-4}$
TN 12-9 (N)	8,2	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-3}$	0,32	$7,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$

#### Ejemplo 7

Estudios de eficacia terapéutica con pepticuerpo de Ang-2 administrado de manera sistémica

15 El pepticuerpo de Ang-2, TN8-Con4-C, se administró por vía subcutánea a ratones portadores del tumor A431 en base al cronograma de una vez al día 72 horas después de la exposición del tumor. Las dosis de pepticuerpo usadas fueron 1000, 200, 40 y 8 ug/ratón/día. Se administró un total de 20 dosis a todos los animales. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron tres veces por semana. Al final del estudio, se sacrificó a los animales y se recogieron sus sueros para medir los niveles del pepticuerpo mediante ELISA. Se recogieron los tumores y un panel de tejidos normales de todos los grupos.

20 Los resultados se muestran en La figura 1. Como se puede ver, se observaron diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre el grupo tratado con el pepticuerpo de Ang-2 y el control de vehículo. Las cuatro dosis de pepticuerpo de Ang-2 inhibieron el crecimiento del tumor en comparación con los controles de vehículo ( $p < 0,0001$  frente al control de vehículo utilizando ANOVA de medidas repetidas). Por el contrario, los tumores en el grupo de control continuaron creciendo a una velocidad mucho mayor. El tratamiento con este pepticuerpo no tuvo ningún efecto significativo sobre los pesos corporales terminales, los pesos de los órganos o los parámetros de hematología de los animales tratados con las dosis anteriores.

#### Ejemplo 8

1. Construcción de genotecas de Péptidos de Ang-2 secundarios

30 A. Células de *E. coli* electrocompetentes

Las células de electroporación competentes Epicurian Coli® XLI-Blue MRF (Estratagen nº 200158) se adquirieron de Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA).

B. Modificación del vector de pCES1

35 Se realizó PCR utilizando los Sistemas de PCR de Molde de Larga Extensión (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) con 1  $\mu$ g del vector pCES1 (TargetQuest Inc.) como molde. El volumen de la mezcla para PCR fue 100  $\mu$ l que contenía tampón 1 x PCR, 200 nM de cada uno de los dos cebadores: 5'-

CAAACGAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (SEQ ID N°: 244) y 5'-  
 GGTGGTGCAGCCGACTGAGACTGTTGAAAGTTGTTAGCA-3' (SEQ ID N°: 245), 200 nM de dNTP y 3 unidades (U) Tag ADN polimerasa. El sistema PCR TRIO-Thermoblock (Biometra) se realizó del siguiente modo: 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos; y 72°C durante 10 minutos; enfriar a 4°C.

Los productos de PCR se desarrollaron sobre un gel de agarosa al 1% y se purificaron con columna de centrifugación QIAGEN (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de conformidad con los protocolos del fabricante. Se realizó una segunda reacción de PCR con 5  $\mu$ l de productos para PCR y 200 nM de cada uno de los dos cebadores 5'-CAAACGAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (SEQ ID NO 246) y 5'-AACACAAAAGTGCACAGGGTGGAGGTGGTGGTGCAGCCGCCT-3' (SEQ ID NO 247, bajo las mismas condiciones de PCR que las descritas anteriormente.

15 Los productos de PCR y el vector PACES1 original se digirieron posteriormente por separado en una reacción de 100  $\mu$ l que contenía tampón 1 x NEB2, 60 U de ApaLI (New England Biolabs, Beverly, MA), 60 U de BamHI (New England Biolabs) a 37° C durante 1 hora. El ADN digerido se purificó utilizando una columna de centrifugación QIAGEN y se ligó conjuntamente en una reacción de 40  $\mu$ l que contenía tampón ligante 1x y 40 U de T4 ADN ligasa (New England Biolabs) a temperatura ambiente durante toda la noche.

Los vectores se transfecaron en *E. coli* y se incubaron a 37°C durante la noche. Las colonias individuales aisladas se seleccionaron y el plásmido se purificó utilizando una columna de centrifugación QIAGEN. Mediante secuenciación de ADN se confirmó la inserción correcta.

## 20 C. Preparación del ADN del vector

Un microgramo de ADN vector de pCESI modificado (de la sección 1B anterior) se transformó en 40  $\mu$ l de XL1 - blue E. coli electrocompetente (de la sección 1A anterior) usando el Gene Pulser II (BIO-RAD, Hercules, CA) fijado a 2500 V, 25  $\mu$ F, y 200 ohms. La muestra de bacterias transformadas se transfirió inmediatamente a un tubo que contenía 960  $\mu$ l de SOC (2% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 20 mM de glucosa, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>), y se dejó cultivar a 37°C con agitación durante 1 hora.

Las células se extendieron sobre la placa de agar 2xYTAGT (2xYT con 100 ug/ml de ampicilina, 12,5 ug/ml de tetraciclina y 2% de glucosa) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se confirmó una sola colonia mediante secuenciación y se usó para inocular 2 litros del medio 2xYTAGT a 37°C con agitación durante la noche. El ADN vector plasmídico se purificó con el kit de QIAGEN Plasmid Maxi de conformidad con los protocolos del fabricante.

### 30 D. Digestión del ADN de vector

Aproximadamente 2000 microgramos totales de ADN vector (de la sección 1C anterior) se dirigieron en una reacción de 5000  $\mu$ l que contenía 1x tampón 2 NEB, 300 U de ApaLI y 300 U de Xhol a 37°C durante toda la noche. La reacción de digestión y restricción se incubó durante toda la noche a 37°C y se analizó en un gel de agarosa al 0,8% prefabricado (Embi Tec, San Diego, CA). A continuación, el ADN vector linealizado se escindió del gel y se extrajo con el Kit de Extracción de Gel QIAquick (QIAGEN Inc.) de conformidad con las instrucciones del fabricante.

## E. Preparación de oligonucleótidos de la genoteca

Seis oligonucleótidos de genoteca (1 fijado y 5 dopados) se diseñaron en base a las secuencias que se derivan de los resultados descritos anteriormente. Los oligonucleótidos de la genoteca fijada fueron los siguientes:

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNS  
ARTGGGATCCGTGGASCNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKCAT  
CTCTCGAGATCA- (No. de genoteca 20) (SEQ ID NO: 248);

40 y dos del 70% de los oligonucleótidos de la genoteca dopados fueron los siguientes:

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKaaKcgKccKNNKga  
KgaKatKttKggKggKNNKacKtaKcaKNNKNNKNNKCATTCTC  
TCGAGATCA-3' (No. de genoteca 27) (SEQ ID NO: 249);  
5'-CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga  
KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKCATTCTCTCGAGATCA-  
3' (No. de genoteca 99) ; (SEQ ID NO: 250);

Las letras en minúscula representan una mezcla del 70% de la base indicada y el 10% de cada uno de los otros tres nucleótidos. Los otros tres del 91% de los oligonucleótidos de la genoteca dopados fueron los siguientes:

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKcaKgaKgaKTGCgaKtg  
 KgaKccKtgKacKTGCgaKcaKatKNNKNNKNNKCATTCTCTCGAGA  
 TC A-3' (No. de genoteca 94) ; (SEQ ID NO: 251);  
 5'-CACAGTGCACAGGGTNNKttKgaKtaKNNKgaKggKgtKgaKgaKcc  
 KttKacKttKggKNNKgaKaaKcaKNNKCATTCTCTCGAGATCA-3'  
 (No. de genoteca 25); (SEQ ID NO: 252);

5 y

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga  
 KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKCATTCTCTCGAGATCA-  
 3' (No. de genoteca 26) ; (SEQ ID NO: 253);

Para los oligos anteriores, los entendidos en la técnica apreciarán que "N" indica que cada uno de los cuatro nucleótidos (A, T, C, y G) se representan de igual forma durante la síntesis de oligo y "K" indica que los nucleótidos G y T se representaron de igual manera durante la síntesis de oligo. Las letras en minúscula representan una mezcla del 91 % de la base indicada y el 3 % de cada uno de los tres nucleótidos. Cada uno de estos oligonucleótidos se usó como molde en la PCR.

El kit de Sistema de PCR de Fidelidad de Alta Expansión (Roche Diagnostics Corp.) se usó para las reacciones de PCR. Cada oligo de la genoteca se amplificó en una placa de reacción de PCR de 96 pocillos de 50  $\mu$ l que contenía 1 nM de un oligonucleótido de genoteca, 1X del tampón de PCR, 300 nM de cada uno de los cebadores:

15 5'-CACAGTGCACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 254); y  
 5'-TGATCTCGAGAGAATG-3', (SEQ ID NO: 255);

20 200  $\mu$ M de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 350 U de la polimerasa de expansión. El termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) se utilizó para llevar a cabo el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos; 25 ciclos de (94°C durante 30 segundos, 52.5°C durante 60 segundos, 72°C durante 30 segundos); 72°C durante 10 minutos; enfriar a 4°C. Los nucleótidos libres se retiraron posteriormente con el Kit de Purificación de PCR QIAquick (QIAGEN Inc. N° de catálogo 28104) de conformidad con los protocolos del fabricante.

#### F. Digestión de los oligonucleótidos de la genoteca

25 Para cada genoteca, los productos de PCR (sección IE) se digirieron en una reacción de 1200  $\mu$ l que contenía tampón 2 1 x NEB, 750 U de ApaLI y 750 U de Xhol a 37°C durante la noche. El ADN digerido se separó sobre un gel de agarosa al 3% prefabricado (Embi Tec). La banda de ADN de interés de cada reacción se cortó del gel y se extrajo con un filtro de tubo centrifugador COSTAR Spin-X, 0,22  $\mu$ m de acetato de celulosa (Corning Inc., N° de catálogo 8160).

#### G. Unión del vector con los oligonucleótidos de la genoteca

30 La reacción de unión de 450  $\mu$ l contenía el vector linealizado (sección 1D) y cada producto de PCR de la genoteca digerido (sección F) en una relación molar de 1:5, 1 x NEB de tampón de ligamiento, y 20.000 U de T4 ADN ligasa a 16°C durante toda la noche. Los productos ligados se incubaron a 65°C durante 20 minutos para inactivar la T4 ADN ligasa y se incubaron con 100 U de NotI a 37°C durante 2 horas para minimizar el autoligamiento del vector. Los productos ligados se purificaron posteriormente mediante una extracción en fenol/cloroformo convencional (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al, 3a Edición, Cold Spring Harbor Laboratoy Press, 2000) y se volvieron a suspender en 120  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

#### H. Transformación por Electroporación

40 Para cada genoteca, se realizaron doce reacciones de electroporación. Para cada transformación, se mezclaron 10  $\mu$ l del ADN vector ligado (sección 1G) y 300  $\mu$ l de células XL1 -BLUE MRF (sección 1A) en una cubeta de 0,2-cm (BIO-RAD). La mezcla resultante se sometió a pulsos con el Pulsador II de Genes fijado a 2500 V, 25 uF, y 200 ohms. Las bacterias transformadas de las doce reacciones de electroporación se combinaron y se trasladaron a un matraz que contenía 26 ml de SOC para su incubación a 37°C durante 1 hora. Las células se añadieron a 450 ml de

2xYTAG y se cultivaron a 37°C con agitación durante 5 horas. Las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Tras ello, los sedimentos celulares se volvieron a suspender en 12 ml de 15% de glicerol/12xYT y se almacenaron a -80°C. Consistió de la reserva primaria de las genotecas. Los títulos mostraron tamaños de genoteca de transformantes independientes de  $5,0 \times 10^9$  (número de genoteca 20),  $3,3 \times 10^{10}$  (número de genoteca 94),  $4,7 \times 10^9$  (número de genoteca 25),  $5,0 \times 10^9$  (número de genoteca 26),  $3,0 \times 10^9$  (número de genoteca 27), y  $4,2 \times 10^9$  (número de genoteca 99).

## 2. Amplificación de las Genotecas

### A. Preparación de reserva secundaria de las Genotecas

De la reserva de células de genoteca primaria (de la sección 1H anterior), se usaron suficientes células para cubrir un exceso de 10X de cada tamaño de genoteca para inocular el medio 2xYTGT (2YT con 100 ug/ml de ampicilina, 12,5 ug/ml de tetraciclina y 2% de glucosa) de manera que la OD600 de partida fuera 0,1. Se dejó que los cultivos se desarrollaran a 37°C con agitación durante varias horas hasta que la OD600 = 0,5. Una décima parte de alicuota de cada genoteca se recogió y se desarrolló en matraces separados por otras dos horas a 37°C. Estos subcultivos se centrifugaron posteriormente a 4000 rpm utilizando un rotor Beckman JA-14 durante 10 minutos a 4°C, y los sedimentos de bacterias se volvieron a suspender en 7,0 ml (para cada genoteca) de 15% de glicerol 12xYT para el almacenamiento a -80°C.

### B. Inducción del fago

Alicuotas de fago auxiliar M13K07 (Amersham Pharmacia Biotech) se añadieron a los cultivos bacterianos restantes a una OD600 = 0,5 (de la Sección 2A anterior) hasta lograr la concentración final de  $3 \times 10^9$  pfu/ml. Se dejó que el fago auxiliar infectara las bacterias a 37°C durante 30 minutos sin agitación y 30 minutos con agitación lenta. Las células infectadas se centrifugaron a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. Los sedimentos de células se volvieron a suspender en el mismo volumen (de la sección 2A anterior) con el medio 2xYTAK (2YT con 100 ug/ml de ampicilina y 40 ug/ml de kanamicina). La producción de fagémido se produjo a 30°C durante toda la noche con agitación.

### C. Recolección del fago

Los cultivos de bacterias de la sección 2B anterior se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se trasladaron a nuevas botellas, y se añadieron 0,2 volúmenes de 20% de PEG/NaCl 2,5 M y se incubaron sobre hielo por 1 hora para precipitar los fagémidos. Los fagémidos precipitados se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se volvieron a suspender cuidadosamente con 100 ml de PBS fría. La solución de fagémido se purificó a través de la centrifugación de las células remanentes a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y de la precipitación de los fagémidos mediante la adición de 0,2 volúmenes de 20% de PEG/NaCl 2,5M. Los fagémidos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, y los sedimentos de fagémidos se volvieron a suspender con 18 ml de PBS fría. Se añadieron seis ml de 60% de solución de glicerol a la solución de fagémido para su almacenamiento a -80°C. Las titulaciones del fagémido se determinaron mediante un procedimiento estándar (Molecular Cloning, Maniatis et al 3a Edición).

## 3. Selección del fago de enlace a Ang-2

### A. Inmovilización de Ang-2 sobre perlas magnéticas

El Ang-2 biotinilado (de la sección 3A anterior) se inmovilizó sobre estreptavidina Dynabead M-280 (DYNAL, Lake Success, NY) a una concentración de 2000 ng de proteína Ang-2 por 100 µl de la reserva de perlas del fabricante. Despues de mover las perlas a un lado de un tubo utilizando un imán y pipeteando el líquido hacia afuera, las perlas se lavaron dos veces con la solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se volvieron a suspender en PBS. La proteína Ang-2 biotinilada se añadió a las perlas lavadas en la concentración anterior y se incubó con rotación por 1 hora a temperatura ambiente. Las perlas recubiertas con Ang-2 se bloquearon mediante la adición de BSA hasta un 2 % de concentración final e incubación durante la noche a 4°C con rotación. Las perlas recubiertas con Ang-2 resultantes se lavaron dos veces con PBST (PBS con 0,05% de Tween-20) antes de someterse a los procedimientos de selección.

### B. Selección mediante el uso las perlas recubiertas con Ang-2

Fagémidos equivalentes a aproximadamente 1000 veces una genoteca (de la sección 2C anterior) se bloquearon durante una hora con 1 ml de PBS que contenía un 2% de BSA. La muestra de fagémido bloqueado se sometió a tres etapas de selección negativa mediante la adición de perlas vacías (las mismas perlas que en la sección 3A pero sin revestimiento de proteína Ang-2), y esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos con rotación. El sobrenadante que contenía fagémido se extrajo usando un imán y se trasladó a un segundo tubo que contenía perlas vacías (las mismas perlas que en la sección 3A pero sin revestimiento de proteína Ang-2), y esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos con rotación.

El procedimiento se repitió. El sobrenadante que contenía el fagémido se extrajo con un imán y se trasladó a un nuevo tubo que contenía perlas revestidas con proteína Ang-2 (de la sección 3A), y la mezcla se incubó a

temperatura ambiente durante 1 hora con rotación. Despues que el sobrenadante se desechó, las perlas unidas al fagémido se lavaron 10 veces con un 2% de leche-PBS; 10 veces con 2% de BSA-PBS; 10 veces con PBST y dos veces con PBS. Se dejó que los fagémidos eluyeran en 1 ml de 100 mM de solución de trietilamina (Sigma, St. Louis, MO) por 10 minutos en un rotador. El pH de la solución que contiene fagémido se neutralizó mediante la adición de 0,5 ml de Tris-HCl 1 M (pH 7,5). Los fagémidos resultantes se usaron para infectar 10 ml de bacterias XL1-Blue MRF recientemente desarrolladas (OD<sub>600</sub> aproximadamente 0,5) a 37°C durante 30 minutos sin agitación y 30 minutos con agitación lenta. Todas las células de XL1-BLUE MRF se sembraron sobre una placa 2xYTAK de 15 X 15 cm y se incubaron a 30°C durante toda la noche.

5 C. Inducción y recolección de Fagos

10 Una alícuota de 10 ml del medio 2xYTAKT se añadió a la placa (de la sección 3B) para volver a suspender las células XL1-BLUE MRF. Se recogieron todas las células XL1-BLUE MRF en un tubo, y una alícuota de 250 µl de estas células se añadió a 25 ml de 2xYTAKT y se desarrolló a 37°C hasta la OD<sub>600</sub> = 0,5. El fago auxiliar M13K07 se añadió a una concentración final de 3 x 10<sup>9</sup> cfu/ml y se incubó a 37°C durante 30 minutos sin agitación y 30 minutos con agitación lenta. Las células se centrifugaron con 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se volvieron a suspender con 25 ml de 2xYTAK. Se dejó que estas bacterias se desarrollaran a 30°C durante toda una noche con agitación. Se recolectaron los fagémidos inducidos y se purificaron como en la sección 2C.

15 D. Segunda Ronda de Selección

20 La segunda ronda de selección se realizó como se indica en la sección 3B a 3C excepto por lo siguiente. Aproximadamente fagémidos equivalentes a aproximadamente 100 veces una genoteca que resulta de la sección 3C se utilizaron como el fagémido de entrada. La cantidad de proteína Ang-2 biotinilada (sección 3A) revestida sobre estreptavidina Dynabead M-280 se disminuyó a 20 ng. Las perlas unidas a los fagos se lavaron 10 veces con 2% de leche-PBS; 10 veces con un 2% de BSA-PBS; 10 veces con PBST, y el lavado final implicó 60 minutos de incubación a temperatura ambiente en PBST. Las perlas se lavaron dos veces con PBS. Las condiciones de elución fueron las mismas que en la primera ronda (sección 3B).

25 E. Tercera Ronda de Selección

30 La tercera ronda de selección se realizó como se indica en la sección 3B a 3C excepto por lo siguiente. Aproximadamente fagémidos equivalentes a aproximadamente 100 veces una genoteca que resultan de la sección 3D se utilizaron como el fagémido de entrada. Se utilizaron aproximadamente 2 ng de proteína Ang-2 biotinilada (de la sección 3A) para recubrir en estreptavidina Dynabead M-280. Las perlas unidas a los fagos se lavaron 10 veces con 2% de leche-PBS; 10 veces con un 2% de BSA-PBS; 10 veces con PBST, y el lavado final implicó 60 minutos de incubación a temperatura ambiente en PBST. Las perlas se lavaron dos veces con PBS. Las condiciones de elución fueron las mismas que en la primera ronda (sección 3B).

35 F. Cuarta Ronda de Selección

35 La cuarta ronda de selección se realizó como se indica en la sección 3B a 3C excepto por lo siguiente. Los fagémidos equivalentes de la genoteca que se producen en la sección 3E se utilizaron como el fagémido de entrada. La cantidad de proteína Ang-2 biotinilada (sección 3A) revestida en estreptavidina Dynabead M-280 se disminuyó hasta 0,4 ng para las genotecas 25, 26, y 27. Para las genotecas 20 y 94, la cantidad de revestimiento se mantuvo como en la tercera ronda a 2 ng. La genoteca 99 no llegó a la cuarta ronda de selección. Las condiciones de elución eran las mismas que en la primera ronda (sección 3B).

40 4. ANÁLISIS CLONAL

A. Preparación de la placa maestra

Se recogieron colonias individuales de la segunda ronda de selección y se inocularon en placas de 96 pocillos que contenían 120 µl de 2xYTAKT por pocillo. Las placas de 96 pocillos se incubaron en un agitador a 30°C durante toda la noche. Se añadieron cuarenta microlitros de 60% de glicerol por pocillo para almacenamiento a -80 °C.

45 B. ELISA para fagémidos

Alícuotas de aproximadamente 2 µl de células de la placa maestra (de la sección 4A anterior) se inocularon en una placa de 96 pocillos Costar® nueva (Corning Incorporated, Corning, NY, nº de catálogo 9794) que contenía 100 µl de 2xYTAKT por pocillo, y esta nueva placa de células se desarrolló a 37°C hasta aproximadamente OD<sub>600</sub> = 0,5.

50 Se añadieron a cada pocillo cuarenta µl de 2xYTAKT que contenía fago auxiliar M13K07 (1,5 x 10<sup>13</sup> cfu/ml) y la placa de 96 pocillos se incubó a 37°C durante 30 minutos sin agitación y otros 30 minutos con agitación lenta. La placa se centrifugó a 2000 rpm (centrifugadora de mesa Beckman CS-6R) durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se retiraron de los pocillos y cada sedimento de células se volvió a suspender usando 150 µl de 2xYTAK por pocillo. La placa se incubó a 30°C durante la noche para la expresión de fagémido.

La proteína Ang-2 humana se revistió en la placa de 96 pocillos Maxisorp (NUNC) a 1 µg/ml en 1xPBS a 4°C durante

toda la noche. Como control, se revistió 2% de BSA (Sigma) sobre una placa Maxisorp separada. Al día siguiente, los cultivos de células de toda una noche se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se transfirieron diez  $\mu$ l de sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos que contenía una solución BSA/PBS para diluir el sobrenadante a 1:10. Las mezclas resultantes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación para bloquear los fagémidos. Mientras tanto, la placa revestida con proteína Ang-2 se bloqueó con 400  $\mu$ l de solución de BSA/PBS al 2% por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente a la vez que se agitaba. La solución de BSA se desechó, y cada pocillo se lavó tres veces con solución de PBS. Después de la última etapa de lavado, se añadieron 100  $\mu$ l de soluciones de fagémidos bloqueados a cada pocillo de la placa revestida con proteína Ang-2 así como la placa control y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El líquido se desechó, y cada pocillo se lavó tres veces con solución de PBST. Se añadieron 100  $\mu$ l de mAb anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) a una dilución de 15.000 en cada pocillo de las placas revestida con proteína Ang-2 y control, y estas placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El líquido se desechó nuevamente, y cada pocillo se lavó tres veces con solución de PBST. Se añadieron cien  $\mu$ l de sustratos quimioluminiscentes LumiGLO (Laboratorios Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) a los pocillos, y cada pocillo se leyó con la máquina Luminoskan AFCENT DLRearyl (Labsystems, Franklin, MA).

#### C. Secuenciación de los clones de fago

La reacción de PCR se realizó utilizando 1  $\mu$ l de bacteria de cada pocillo de la placa maestro (sección 4A) como modelo. El volumen de cada mezcla de PCR fue 50  $\mu$ l que contiene tampón 1 x PCR, 300 nM de cada uno de los dos cebadores:

- 20 5'-GTTAGCTCACTCATTAGGCAC-3' (SEQ ID NO: 256) y  
 5'-GTACCGTAACACTGAGTTTCG-3', (SEQ ID NO: 257);

200  $\mu$ M de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2,5 U de taq ADN polimerasa (Roche Molecular Biochemicals). El sistema GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) se utilizó para llevar a cabo el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos; 40 ciclos de (94°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos, 72°C durante 90 segundos); 72°C durante 10 minutos; enfriar a 4°C. Los productos de PCR se purificaron con el Kit de Purificación QIAquick 96 PCR (QIAGEN Inc.) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Todos los productos de PCR purificados se secuenciaron con el cebador 5'-TTACACTTATGCTTCG-3' (SEQ ID NO 258) a través del secuenciador ABI 3770 (Perkin Elmer) de conformidad con las instrucciones del fabricante.

#### 5. Clasificación de Secuencias

- 30 Las secuencias de péptidos que se tradujeron de secuencias de nucleótidos (sección 4C anterior) se correlacionaron con los datos de ELISA. Los clones que mostraron OD alta en los pocillos revestidos con Ang-2 y OD baja en los pocillos revestidos con BSA se consideraron más importantes. Las secuencias que aparecieron múltiples veces también se consideraron importantes. Veinticuatro secuencias de péptido de la genoteca 20, 26 secuencias de péptido de la genoteca 94, 7 secuencias de péptido de la genoteca 25, 18 secuencias de péptido de la genoteca 26, 6 secuencias de péptido de la genoteca 27 y 4 secuencias de péptido de la genoteca 99 se eligieron para análisis adicional y la generación de pepticuerpos. Además, once secuencias de consenso de las genotecas 20 y 94, tres secuencias de consenso de las genotecas 26 y 99, y dos de la genoteca 25 se dedujeron y utilizaron para generar pepticuerpos. Los pepticuerpos en la Tabla 7 se evaluaron usando el protocolo de ELISA de neutralización descrito en el Ejemplo 10 de la presente. Los resultados se muestran en la tabla 7.

40

Tabla 7

Afinidad derivada Con4 Pbs maduro	hAng-2:Tie2 IC <sub>50</sub> (nM)	Secuencia de Pepticuerpos (SEQ ID No:)
Con4-44 (C)	0,09	<b>M-Fc-GGGGGAQ- PIRQEECDWDPWTCEHMWEV-LE (SEQ ID NO: 259)</b>
Con4-40 (C)	0,10	<b>M-Fc-GGGGGAQ- TNIQEECEWDPWTCDHMPGK-LE (SEQ ID NO: 260)</b>
Con4-4 (C)	0,12	<b>M-Fc-GGGGGAQ- WYEQDACEWDPWTCEHMAEV-LE (SEQ ID NO: 261)</b>

Con4-31 (C)	0,16	M-Fc-GGGGGAQ- NRLQEVCEWDPWTCEHMENV-LE (SEQ ID NO: 262)
Con4-C5 (C)	0,16	M-Fc-GGGGGAQ- AATQEECEWDPWTCEHMPPRS-LE (SEQ ID NO: 263)
Con4-42 (C)	0,17	M-Fc-GGGGGAQ- LRHQEGCEWDPWTCEHMFDW-LE (SEQ ID NO: 264)
Con4-35 (C)	0,18	M-Fc-GGGGGAQ- VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG-LE (SEQ ID NO: 265)
Con4-43 (C)	0,18	M-Fc-GGGGGAQ- SISHEECEWDPWTCEHMQVG-LE (SEQ ID NO: 266)
Con4-49 (C)	0,19	M-Fc-GGGGGAQ- WAAQEECEWDPWTCEHMGRM-LE (SEQ ID NO: 267)
Con4-27 (C)	0,22	M-Fc-GGGGGAQ- TWPQDKCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 268)
Con4-48 (C)	0,26	M-Fc-GGGGGAQ- GHSQEECGWDPWTCEHMGTS-LE (SEQ ID NO: 269)
Con4-46 (C)	0,26	M-Fc-GGGGGAQ- QHWQEECEWDPWTCDHMPSK-LE (SEQ ID NO: 270)
Con4-41 (C)	0,26	M-Fc-GGGGGAQ- NVRQEKEWDPWTCEHMPVR-LE (SEQ ID NO: 271)
Con4-36 (C)	0,28	M-Fc-GGGGGAQ- KSGQVECWNWDPWTCEHMPRN-LE (SEQ ID NO: 272)
Con4-34 (C)	0,28	M-Fc-GGGGGAQ- VKTQEHCWDWPWTCEHMREW-LE (SEQ ID NO: 273)
Con4-28 (C)	0,30	M-Fc-GGGGGAQ- AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM-LE (SEQ ID NO: 274)
Con4-39 (C)	0,30	M-Fc-GGGGGAQ- PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM-LE (SEQ ID NO: 275)
Con4-25 (C)	0,31	M-Fc-GGGGGAQ- RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK-LE (SEQ ID NO: 276)

Con4-50 (C)	0,38	M-Fc-GGGGGAQ-HGQNMECEWDPWTCEHMFRY-LE (SEQ ID NO: 277)
Con4-38 (C)	0,40	M-Fc-GGGGGAQ-PRLQEECVWDPWTCEHMPLR-LE (SEQ ID NO: 278)
Con4-29 (C)	0,41	M-Fc-GGGGGAQ-RTTQEKEWDPWTCEHMESQ-LE (SEQ ID NO: 279)
Con4-47 (C)	0,44	M-Fc-GGGGGAQ-QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS-LE (SEQ ID NO: 280)
Con4-20 (C)	0,48	M-Fc-GGGGGAQ-QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL-LE (SEQ ID NO: 281)
Con4-45 (C)	0,48	M-Fc-GGGGGAQ-WAQEECAWDPWTCDHMVGL-LE (SEQ ID NO: 282)
Con4-37 (C)	0,49	M-Fc-GGGGGAQ-LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS-LE (SEQ ID NO: 283)
Con4-33 (C)	0,52	M-Fc-GGGGGAQ-PMNQVECDWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 284)
AC2-Con4 (C)	0,52	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 285)
Con4-32 (C)	0,75	M-Fc-GGGGGAQ-KSTQDDCDWDPWTCEHMVGP-LE (SEQ ID NO: 286)
Con4-17 (C)	0,96	M-Fc-GGGGGAQ-GPRISTCQWDPWTCEHMDQL-LE (SEQ ID NO: 287)
Con4-8 (C)	1,20	M-Fc-GGGGGAQ-STIGDMCEWDPWTCAHMQVD-LE (SEQ ID NO: 288)
AC4-Con4 (C)	1,54	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 289)
Con4-1 (C)	2,47	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG-LE (SEQ ID NO: 290)
Con4-C1 (C)	2,75	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 291)
Con4-21 (C)	3,21	M-Fc-GGGGGAQ-TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG-LE (SEQ ID NO: 292)

Con4-C2 (C)	3,75	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 293)
Con4-18 (C)	4,80	M-Fc-GGGGGAQ- WVNEVVCEWDPWTCNHWDTLP-LE (SEQ ID NO: 294)
Con4-19 (C)	5,76	M-Fc-GGGGGAQ- VVQVGMCMQWDPWTCKHMRLQ-LE (SEQ ID NO: 295)
Con4-16 (C)	6,94	M-Fc-GGGGGAQ- AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV-LE (SEQ ID NO: 296)
Con4-11 (C)	9,70	M-Fc-GGGGGAQ- QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR-LE (SEQ ID NO: 297)
Con4-C4 (C)	9,80	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG-LE (SEQ ID NO: 298)
Con4-23 (C)	9,88	M-Fc-GGGGGAQ- TSQRVGCEWDPWTQCQLTYT-LE (SEQ ID NO: 299)
Con4-15 (C)	15,00	M-Fc-GGGGGAQ- QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS-LE (SEQ ID NO: 300)
Con4-9 (C)	20,11	M-Fc-GGGGGAQ- GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG-LE (SEQ ID NO: 301)
Con4-10 (C)	86,61	M-Fc-GGGGGAQ- TQGLHQCEWDPWTCKVLWPS-LE (SEQ ID NO: 302)
Con4-22 (C)	150,00	M-Fc-GGGGGAQ- VWRSQVCQWDPWTCNLGGDW-LE (SEQ ID NO: 303)
Con4-3 (C)	281,50	M-Fc-GGGGGAQ- DKILEECQWDPWTQFFYGA-LE (SEQ ID NO: 304)
Con4-5 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- ATFARQCQWDPWTCALGGNW-LE (SEQ ID NO: 305)
Con4-30 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- GPAQEECEWDPWTCEPLPLM-LE (SEQ ID NO: 306)
Con4-26 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- RPEDMCSQWDPWTWHLQGYC-LE (SEQ ID NO: 307)
Con4-7 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ- LWQLAVCQWDPQTCDHMGAL-LE (SEQ ID NO: 308)

Con4-12 (C)	Sin inhibición	<b>M-Fc-GGGGGAQ-TQLVSLCEWDPWTCRLLDGW-LE</b> (SEQ ID NO: 309)
Con4-13 (C)	Sin inhibición	<b>M-Fc-GGGGGAQ-MGGAGRCEWDPWTCQLLQGW-LE</b> (SEQ ID NO: 310)
Con4-14 (C)	Sin inhibición	<b>M-Fc-GGGGGAQ-MFLPNECQWDPWTCNSNLPEA-LE</b> (SEQ ID NO: 311)
Con4-2 (C)	Sin inhibición	<b>M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCRLLQGW-LE</b> (SEQ ID NO: 312)
Con4-6 (C)	Sin inhibición	<b>M-Fc-GGGGGAQ-WPQTEGCQWDPWTCRLLHGW-LE</b> (SEQ ID NO: 313)
Con4-24 (C)	Sin inhibición	<b>M-Fc-GGGGGAQ-PDTRQGCQWDPWTCRLYGMW-LE</b> (SEQ ID NO: 314)
AC1-Con4 (C)	Sin inhibición	<b>M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCRLLQGW-LE</b> (SEQ ID NO: 315)
AC3-Con4 (C)	Sin inhibición	<b>M-Fc-GGGGGAQ-DKILEECEWDPWTCRLLQGW-LE</b> (SEQ ID NO: 316)
AC5-Con4 (C)	Sin inhibición	<b>M-Fc-GGGGGAQ-AATQEECEWDPWTCRLLQGW-LE</b> (SEQ ID NO: 317)
<b>Afinidad derivada L1 Pbs maduro</b>	<b>hAng-2:Tie2 IC<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>Secuencia de Pepticuerpos (SEQ ID No:)</b>
L1-7 (N)	0,03	<b>MGAQ-TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG-LEGGGGG-Fc</b> (SEQ ID NO: 318)
AC6-L1 (N)	0,03	<b>MGAQ-TNYKPLDELDATLYEHWILQHS-LEGGGGG-Fc</b> (SEQ ID NO: 319)
L1-15 (N)	0,04	<b>MGAQ-QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG-LEGGGGG-Fc</b> (SEQ ID NO: 320)
L1-2 (N)	0,04	<b>MGAQ-LNFTPPLDELEQTLYEQWTLQQS-LEGGGGG-Fc</b> (SEQ ID NO: 321)
L1-10 (N)	0,05	<b>MGAQ-QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA-LEGGGGG-Fc</b> (SEQ ID NO: 322)

L1-13 (N)	0,05	MGAQ-QYEPLDELDETLYNQWMFHQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 323)
L1-5 (N)	0,05	MGAQ-VKYKPLDELDEILYEQQTFQER LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 324)
L1-C2 (N)	0,05	MGAQ-TKFQPLDELDTQLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 325)
L1-C3 (N)	0,06	MGAQ-TNFQPLDELDTQLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 326)
L1-11 (N)	0,07	MGAQ-QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 327)
L1-17 (N)	0,08	MGAQ-VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 328)
L1-12 (N)	0,08	MGAQ-YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 329)
L1-1 (N)	0,08	MGAQ-QNYKPLDELDAATLYEHFIFHYT LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 330)
L1-4 (N)	0,08	MGAQ-VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 331)
L1-20 (N)	0,09	MGAQ-EDYMPPLDALDAQLYEQFILLHG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 332)
L1-22 (N)	0,09	MGAQ-YKFNPMDLEQTLYEELFLFQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 333)
L1-14 (N)	0,11	MGAQ-SNFMPPLDELEQTLYEQFMLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 334)
L1-16 (N)	0,11	MGAQ-QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 335)

L1-18 (N)	0,16	MGAQ-QKFMPPLDELDEILYEQFMFQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 336)
L1-3 (N)	0,16	MGAQ-TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 337)
L1-21 (N)	0,17	MGAQ-HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 338)
L1-C1 (N)	0,56	MGAQ-QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 339)
L1-19 (N)	1,26	MGAQ-QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 340)
L1-9 (N)	1,62	MGAQ-SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 341)
Afinidad derivada Con1 Pbs maduro		
hAng-2:Tie2 IC <sub>10</sub> (nM)		Secuencia de Pepticuerpos (SEQ ID No:)
Con1-4 (C)	1,68	M-Fc-GGGGGAQ-SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL-LE (SEQ ID NO: 342)
Con1-1 (C)	3,08	M-Fc-GGGGGAQ-AGGMRPYDGMGLGWPNYDVQA-LE (SEQ ID NO: 343)
Con1-6 (C)	8,60	M-Fc-GGGGGAQ-GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG-LE (SEQ ID NO: 344)
Con1-3 (C)	16,42	M-Fc-GGGGGAQ-APGQRPYDGMGLGWPPTYQRIV-LE (SEQ ID NO: 345)
Con 1-2 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ-QTWDDPCMHLGPVTWRRCL-LE (SEQ ID NO: 346)
Con1-5 (C)	Sin inhibición	M-Fc-GGGGGAQ-FGDKRPLECMFGGPIQLCPR-LE (SEQ ID NO: 347)
Principal: Con1 (C)	26,00	M-Fc-GGGGGAQ-KRPCEEIFGGCTYQ-LE (SEQ ID NO: 348)
Afinidad derivada 12-9 Pbs maduro	hAng-2:Tie2 IC <sub>50</sub> (nM)	Secuencia de Pepticuerpos (SEQ ID No:)

12-9-3 (C)	0,81	M-Fc-GGGGGAQ-LQEWC EGVEDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 349)
12-9-7 (C)	0,93	M-Fc-GGGGGAQ-MLDYCEG MDDPFTFGCDKQM-LE (SEQ ID NO: 350)
12-9-6 (C)	0,95	M-Fc-GGGGGAQ-HQEYCEG MEDPFTFGCEYQG-LE (SEQ ID NO: 351)
12-9-C2 (C)	1,41	M-Fc-GGGGGAQ-LQDYCEG VEDPFTFGCENQR-LE (SEQ ID NO: 352)
12-9-5 (C)	1,56	M-Fc-GGGGGAQ-LLDYCEG VQDPFTFGCENLD-LE (SEQ ID NO: 353)
12-9-1 (C)	1,84	M-Fc-GGGGGAQ-GFEYCDG MEDPFTFGCDKQT-LE (SEQ ID NO: 354)
12-9-4 (C)	2,05	M-Fc-GGGGGAQ-AQDYCEG MEDPFTFGCEMQK-LE (SEQ ID NO: 355)
12-9-C1 (C)	2,68	M-Fc-GGGGGAQ-LQDYCEG VEDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 356)
12-9-2 (C)	8,42	M-Fc-GGGGGAQ-KLEYCDG MEDPFTQGCDNQS-LE (SEQ ID NO: 357)
<b>Principal: 12-9 (C)</b>	<b>15,00</b>	<b>M-Fc-GGGGGAQ-FDYCEG VEDPFTFGCDNH-LE (SEQ ID NO: 358)</b>

## Ejemplo 9

Seis muestras de pepticuerpos anti-Ang2 se analizaron para verificar su actividad de unión a huAng2 (R&D Systems, BN012103A) en BIACore. La proteína G se inmovilizó a un chip CM5 de conformidad con el protocolo de acoplamiento a amina (BIACore Inc.), y los pepticuerpos se inyectaron posteriormente sobre una superficie de proteína G para captura (RL - 100 Ru). Para analizar en enlace entre hAng2 y el pepticuerpo capturado, se inyectó entre 0,3 nM y 40 nM de huAng2 sobre las superficies del pepticuerpo capturado, y se analizaron los sensogramas de enlace utilizando BIAscan 3.0 (BIACore Inc.). La Tabla 8 resume los resultados de este experimento.

Tabla 8

Pepticuerpo	Nº de Lote	KD (M)	ka (1 /Ms)	kd (1/s)
Con4-44 (C)	011702	2,1E-10	2,9E+05	5,9E-05
L1-7 (N)	022102	2,4E-10	3,7E+05	8,7E-05
L1-10 (N)	021302	7,7E-10	1,5E+05	1,1E-04
L1-21 (N)	021802	2,4E-10	5,6E+05	1,4E-04
Con4 (C)	33456-77	3,8E-10	5,3E+05	2,0E-04
2xCon4 (C) 1 K	092501	3,4E-10	4,8E+05	1,6E-04

## Ejemplo 10

## ELISA de neutralización

Los medios acondicionados con Ang-2 humana, murino, de cino, y de rata y Ang-1 humana y murina se diluyeron en DMEM/50 µg/ml de BSA de la siguiente manera: hAng-2 - dilución 1:64; mAng-2 - dilución 1:64; Ang-2 de rata no diluido; cino Ang-2 - dilución 1:32; hAng-1 - dilución 1:4; y mAng-1 - dilución 1:4.

- 5 El grado al que cada uno de estos medios acondicionados se diluyó se determinó mediante su capacidad para enlazarse a hTie2-Fc 1 nM (proporcionado en forma de una molécula de Tie-2-Fc donde la parte de Tie-2 contiene solamente la parte extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI) a 50% del mayor enlace obtenible (es decir, meseta). Las placas de microtitulación se revistieron con 100 µl de los medios acondicionados diluidos. Para ELISA de neutralización de Ang-2, pepticuerpos anti-Ang-2 candidatos se titularon
- 10 desde 62,5 nM a 0,015 pM en 4 diluciones en una solución de PBS que contiene aproximadamente 1% de BSA y aproximadamente 1 nM de Tie-2 (suministrado en forma de molécula Tie-2-Fc, donde la parte Tie-2 contiene solamente la porción extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Para los ELISA de neutralización de Ang-2, los pepticuerpos anti-Ang-2 candidatos se titularon desde 1000 nM a 0,2 pM en 4 diluciones en una solución de PBS que contiene aproximadamente 1% de BSA y aproximadamente 1 nM de Tie-1 (suministrado en forma de molécula Tie-2-Fc, donde la parte Tie-2 contiene solamente la porción extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI).
- 15

Posteriormente a cada pocillo se añadieron aproximadamente 100 microlitros de la solución pepticuerpo/Tie -2, las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y se lavaron cinco veces en PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Despues del lavado, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de anticuerpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., nº de catálogo 557039) hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente 1 microgramo por ml, y las placas se incubaron durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG-HRP de cabra anti-ratón (Pierce Chemical Co., nº de catálogo 31432) a una dilución de 1:10.000 en PBS que contenía aproximadamente 1 por ciento de BSA.

- 20
- 25 Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, después de lo cual se lavaron cinco veces con PBS que contenía aproximadamente 0,1 por ciento de Tween-20. Se añadieron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato TMB (SIGMA, nº de catálogo T8665) y se dejó que se desarrollara el color azul. Despues se leyó la absorbancia a aproximadamente 370 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se muestran en la tabla 9 a continuación.

30

Tabla 9

Neutralización mediada por pepticuerpos de angiopoietina: Interacciones Tie2						
	<b>hAng-2</b>	<b>mAng-2</b>	<b>rAng-2</b>	<b>cAng-2</b>	<b>hAng-1</b>	<b>mAng-1</b>
<b>Pepticuerpo</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>					
2xCon4 (C)	0,026	0,035	0,024	0,047	3,0	3,2
Con4 (C)	0,197	0,289	0,236	0,540	200	300
Con4-44 (C)	0,08	0,16	0,22	----	43	----
Con4-40 (C)	0,20	0,27	0,35	----	> 1000	---
L1-7 (N)	0,046	0,063	0,035	0,108	> 1000	> 1000
L1-21 (N)	0,179	0,249	0,204	0,608	> 1000	> 1000
L1-10 (N)	0,06	0,06	0,06	---	> 1000	----

## Ejemplo 11

## Estudio PK

## Diseño del estudio

- 35 Ratones macho CD-1, que pesan 20 - 30 g, se dividieron al azar en cada grupo de tratamiento de pepticuerpo (2xCon4-C, L1-7-N, y L1-21 -N). Los animales recibieron un único bolo IV (n = 38/grupo) o una única administración SC de 50 µg de pepticuerpo (n = 34/grupo). Las inyecciones se realizaron mediante la vena de la cola y bajo la piel sobre los hombros para las administraciones IV y SC, respectivamente.

## Obtención de muestras de sangre y procedimientos analíticos

- 40 Se recogieron muestras de sangre para cada medición de concentración de pepticuerpos de anti-Ang2 antes de la dosis, y 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 216, 264, 312 y 336 horas después de la administración de la

dosis para los grupos SC y IV. Se recogieron muestras adicionales a los 5 y 30 minutos después de la dosis para los grupos IV. Se tomaron muestras de sangre de dos animales por punto de tiempo y se los sacrificó después de la obtención de la muestra. Se recogió sangre (aproximadamente 0,50 ml) de una punción cardíaca en tubos separadores de suero de polipropileno microtainer®. Las muestras se mantuvieron en hielo por aproximadamente 20 minutos o hasta que se formó el coágulo. El suero se separó de las muestras de sangre mediante centrifugación por aproximadamente 10 minutos a 2 – 8°C, y se almacenó a aproximadamente -70°C hasta que se analizó. Las muestras se midieron utilizando un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo verificado (TRF) con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 100 ng/mL. Las placas de microtitulación NUNC fluoroMaxisorp se revistieron con proteína Ang-2 de ratón recombinante. Posteriormente las placas se bloquearon con una solución de proteína para reducir el enlace no específico. Se prepararon controles de calidad convencionales, y muestras desconocidas en un tampón de ensayo de suero de ratón al 10% y se colocaron con pipetas en pocillos de placas de microtitulación. Los pepticuerpos se enlazaron específicamente a Ang-2 inmovilizada. Después de retirar por lavado cualquiera de las sustancias no ligadas (Kirkegaard & Pery Laboratories Inc.), un anticuerpo monoclonal biotinilado IgG (H+L) de cabra anti-Humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) se añadió a los pocillos. Después de una etapa de lavado para retirar cualquier anticuerpo monoclonal biotinilado no enlazado, se añadió estreptavidina marcada con europio a los pocillos. Después de eliminar por lavado el europio no ligado a estreptavidina, el europio ligado se liberó de la estreptavidina con una solución de ácido pipeteado en cada pocillo. Se generó la señal fluorescente y se leyó en el lector fluorométrico de Wallac. El intervalo de ensayo para el análisis de pepticuerpo de anti-Ang-2 en suero de ratón es 0,078 - 5 µg/ml.

## 20 Análisis farmacocinético

Los datos de concentración-tiempo del medio del compuesto para cada grupo se sometieron a análisis no compartimental usando WinNonlin Professional (Version 3.3, Pharsight Corp., Mountain View, CA). Los tiempos de muestreo nominales se usaron para el análisis de PK, a medida que se recogían las muestras dentro del 10% del tiempo nominal. Todos los valores de concentración menores que el valor de LLOQ se fijaron en cero antes del análisis de PK. Se estimaron los siguientes parámetros PK:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}}$$

- Se calculó la vida media terminal ( $t_{1/2}$ ) como  $\frac{\ln(2)}{k_{el}}$  donde  $K_{90}$  era la constante de velocidad terminal de primer orden estimada mediante regresión lineal de la fase de disminución lineal logarítmica terminal.
- El área bajo la curva concentración – tiempo del suero ( $AUC_{(0-\text{último})}$ ) se estimó usando el procedimiento trapezoidal lineal/logaritmo desde el tiempo 0 hasta el último, el tiempo de la última concentración cuantificable ( $C_{\text{último}}$ ).
- El área bajo la curva desde 0 hasta infinito ( $AUC_{(0-\infty)}$ ) se estimó como la suma de  $AUC_{(0-\text{último})}$  y los valores de  $C_{\text{último}}/K_{el}$

$$AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-\text{último})} + \frac{C_{\text{último}} \text{ estimado}}{k_{el}}$$

- La biodisponibilidad absoluta (F) después de la administración SC se calculó como:

$$F = \frac{AUC_{(0-\infty)SC}}{AUC_{(0-\infty)IV}} \times 100$$

35

Los resultados se muestran en la Figura 2.

## Ejemplo 12

El día de estudio 0 se inyectó a ratones hembras atípicos  $1 \times 10^7$  de células A431 por vía subcutánea. El día 3, el pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C se administró por vía subcutánea en una dosis de 200 µg/ratón/día. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron en intervalos regulares, como se muestra en la figura. Se observaron diferencias significativas en desarrollo del tumor entre el grupo tratado con pepticuerpo de Ang-2 y el control de vehículo y pepticuerpo de control ( $p < 0,0001$  contra cada control usando ANOVA de medición repetida, con la prueba post hoc de Scheffe). El tratamiento con este pepticuerpo no tuvo efecto significativo alguno sobre los pesos corporales. Los resultados se muestran en la Figura 3.

45 Ejemplo 13

## Curva de crecimiento In Vitro A431

Las células A431 se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a 2000 células por pocillo, en 200 µl de

DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS). El medio se aspiró 16 horas después de la siembra. Se volvieron a colocar en los pocillos y se realizó por triplicado: 100  $\mu$ l por pocillo de DMEM, 10% de FBS, 1 mg/ml de pepticuerpo de control negativo 4883 o pepticuerpo TN8-Con4. Se repitieron las mismas realizaciones sobre 5 placas. Se aspiró el medio de una placa 24, 48, 72, 96, y 120 horas después del tratamiento. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ l de ácido trifluoroacético al 10% (TCA) por pocillo, y las placas se almacenaron a 4°C. Todas las placas se recolectaron cuando la última placa había estado en TCA al 10% durante un mínimo de 4 horas. Se retiró TCA al 10% con agitación, y los pocillos se enjuagaron 5 veces con agua corriente. Las células se tiñeron con 100  $\mu$ l de 0,4% de sulforrodamina B (Sigma S-9012) en 1% de ácido acético (Sigma A-6283) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después se lavaron 5 veces con 1% de ácido acético. Las placas se secaron al aire. El tinte se solubilizó con 300  $\mu$ l de 120 mM de Tris no tamponado (pH>10) por 2 horas en un agitador rotatorio. Después se leyó la densidad óptica (DO) a 540 nm en un lector de placas de microtitulación. Los resultados se muestran en la Figura 4.

#### Ejemplo 14

Se inyectó a hembras atímicos por vía subcutánea  $2 \times 10^6$  células Colo-205 más Matrigel (2:1) el día del estudio 0. El día 3, los pepticuerpos de Ang-2 L1-7-N, L1-21-N, Con4-C, y 2xCon4-C se administraron por vía subcutánea en una dosis de 14  $\mu$ g/ratón, dos veces por semana. Se administró anticuerpo Ab536 Anti-Ang-2, 47  $\mu$ g/ratón, tres veces por semana, como un control positivo. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron a intervalos regulares.

Se observaron diferencias significativas en el desarrollo del tumor entre cada uno del grupo tratado con pepticuerpo de Ang-2 contra el control de vehículo y pepticuerpo de control ( $p < 0,0001$  contra cada control usando ANOVA de medida repetida, con la prueba post hoc de Scheffe). El tratamiento con estos pepticuerpos no tuvo efecto significativo sobre los pesos corporales (los resultados no se han mostrado). Los resultados se muestran en la Figura 5.

#### Ejemplo 15

Se inyectó a hembras atímicos por vía subcutánea  $2 \times 10^6$  células Colo-205 más Matrigel (2:1) el día de estudio 0. El día 3, el pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C se administró por vía subcutánea en dosis de 14, 2,8 y 0,56  $\mu$ g/ratón, dos veces por semana. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron en intervalos regulares, como se ha mostrado. Se observaron diferencias significativas en el desarrollo del tumor entre las dos dosis más altas del grupo tratado con pepticuerpo de Ang-2 frente al control de vehículo y pepticuerpo de control ( $p = 0,003$  para la dosis intermedia y  $p < 0,0001$  para la dosis alta, usando ANOVA de medida repetida, con la prueba post hoc de Scheffe). El tratamiento con estos pepticuerpos no tuvo efecto significativo sobre los pesos corporales. La línea punteada representa el n total del grupo, de 10 a 9 ratones, debido a la muerte de un ratón por razones desconocidas. Los resultados se muestran en la Figura 6.

#### Ejemplo 16

##### 35 Pepticuerpos Anti-Ang-2 contra Tumores de xenoinjerto de Colo-205

Se inyectó a ratones hembras atímicos por vía subcutánea  $2 \times 10^6$  células Colo-205 más Matrigel (2:1) el día de estudio 0. El día 3, el pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C o pepticuerpo de control se administraron por vía subcutánea en dosis de 350  $\mu$ g/ratón. Los tumores de los grupos tratados con pepticuerpo de control (como se describe en la Tabla 5) se recogieron el día 14 (control coincidente de tamaño) o el día 18 (control coincidente de tiempo). Los tumores del grupo tratado con 2xCon4-C se recogieron el día 18. Los volúmenes del tumor se registraron en intervalos regulares como se muestra. Se observaron diferencias significativas en el crecimiento del tumor entre el grupo de control coincidente de tiempo y el grupo tratado con 2xCon4-C ( $p = 0,0154$  mediante ANOVA de medida repetida, con prueba post hoc de Scheffe). El tratamiento con estos pepticuerpos no tuvo efecto significativo alguno sobre los pesos corporales.

45 Los tumores preparados para análisis de formación de imágenes se biseccionaron en forma de corona y una mitad se congeló de manera ultrarrápida en OCT (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA). Las crio secciones se tiñeron de manera inmunológica usando CD31 anti-ratón (nº de catálogo 553370, BD PharMingen, San Diego, CA) a 2  $\mu$ g/ml, con DAB como el cromógeno. Las secciones del tumor se fotografiaron de manera digital con un aumento de objetivo de 20X. Se capturaron cuatro campos de punto de acción por tumor, con diez tumores por grupo de tratamiento. Se usó un sistema de análisis de imagen MetaMorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) para establecer el umbral para los vasos sanguíneos teñidos con CD31 dentro de las imágenes. Las áreas de tinción positiva de CD31 se expresaron como una proporción del tejido tumoral total dentro de cada campo. Los resultados se muestran en la Figura 7.

#### Ejemplo 17

55 Se inyectó a ratones hembras atímicos por vía subcutánea  $2 \times 10^6$  células Colo-205 más Matrigel (2:1) el día del estudio 0. El tratamiento dos veces por semana, con 350  $\mu$ g/ratón del pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C, o pepticuerpo de control equivalente comenzó el día de estudio 3, 10 o 15. Se registraron los volúmenes del tumor y

los pesos corporales a intervalos regulares. Se observaron diferencias significativas en desarrollo del tumor entre el grupo tratado con pepticuerpo de Ang-2 y el control de vehículo ( $p = 0,089$  para el grupo del día 15 y  $p < 0,0001$  para los grupos de los días 3 y 10, usando ANOVA de medida repetida, con prueba post hoc de Scheffe). El tratamiento con estos pepticuerpos no tuvo efecto significativo sobre los pesos corporales. Los resultados se muestran en la Figura 8 (pesos corporales no mostrados).

5 Ejemplo 18

Se obtuvo un resumen de las tasas de respuesta completa (RC) usando el anticuerpo Ab536 a 47  $\mu\text{g}/\text{ratón hembra}$  atímico, administrado por vía intraperitoneal tres veces por semana, o con pepticuerpo 2xCon4(C), proporcionado de manera subcutánea en programas de dosificación múltiple en diferentes estudios de larga duración ( $\geq 10$  semanas de dosificación) tanto en los modelos de xenoinjerto A431 como de Colo-205. CR, como se utiliza en la presente, se refiere a un resultado donde no queda tumor medible alguno después del tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 9.

10 Ejemplo 19

a) Combinación de Pb con taxotere en el modelo de tumor Colo-205

15 Se inyectó a ratones hembras atímicos por vía subcutánea  $2 \times 10^6$  células Colo-205 más Matrigel (2:1) el día de estudio 0. El día de estudio 14, se comenzaron los tratamientos a) dos veces por semana, con 350  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  del pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C, b) 20 mg/kg de qwx3 i. p. de taxotere, o c) una combinación de ambos. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron a intervalos regulares. Se observaron diferencias significativas en el crecimiento del tumor entre todos los grupos de tratamiento y el control de vehículo ( $p < 0,0001$  usando ANOVA de medida repetida, con prueba post hoc de Scheffe). Además, el grupo de terapia de combinación era significativamente diferente a cualquiera de los agentes de monoterapia ( $p < 0,0001$  frente 2xCon4-C y  $p = 0,0122$  frente a taxotere). La línea punteada representa el n total del grupo, de 10 a 9 ratones, debido a la muerte de un ratón por razones desconocidas. El tratamiento con estos pepticuerpos no tuvo efecto significativo sobre los pesos corporales. Los resultados se muestran en la Figura 10a.

20 Ejemplo 20

25 b) Combinación de Pb con 5-FU en el modelo de tumor Colo-205

Se inyectó a ratones hembras atímicos por vía subcutánea  $2 \times 10^6$  células Colo-205 más Matrigel (2:1) el día de estudio 0. El día de estudio 14, se comenzaron los tratamientos a) s. c dos veces por semana con 350  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  del pepticuerpo de Ang-2 2xCon4-C, b) 50 mg/kg de qwx5 i. p. de 5-FU o c) una combinación de ambos. Los volúmenes del tumor junto con los pesos corporales se registraron a intervalos regulares, como se ha mostrado.

30 Se observaron diferencias significativas en el crecimiento del tumor entre todos los grupos de tratamiento frente al control de vehículo ( $p < 0,0001$  usando ANOVA de medida repetida, con prueba post hoc de Scheffe). Además, el grupo de terapia de combinación fue significativamente diferente a cualquiera de los agentes de monoterapia ( $p=0,0375$  frente a 2xCon4-C y  $p = 0,0453$  frente a 5-FU). Se observó una reducción transitoria en el peso corporal del grupo tratado con 5-FU (18% en el día de estudio 20) así como con el grupo de terapia de combinación (16% en el estudio del día 20), seguido de una recuperación completa de los pesos corporales. Los resultados se muestran en la Figura 10b.

35 Ejemplo 20

Modelo de artritis de adyuvante

40 Ratas macho de Lewis (120 - 130 g, Charles River, Wilmington MA) se alojaron de a dos por jaula tapada con filtro en una habitación controlada ambientalmente (temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa  $50 \pm 20\%$ ) en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Los animales se alimentaron mediante un pienso de roedor comercial (Formulación 8640; Tek Lab, Madison, WI) y recibieron agua corriente purificada por filtro a voluntad. Los contenidos en calcio y fósforo dietéticos fueron de 1,2% y 1 0%, respectivamente.

45 La artritis de adyuvante se indujo mediante una única inyección de 0,5 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra matada por calor (Difco Laboratories, Detroit, MI) suspendida en 0,05 ml de aceite de parafina (Crescent Chemical Co., Hauppauge, NY) por vía intradérmica en la base de la cola. La aparición clínica de la artritis fue el día 9 como se indica mediante la inflamación de la pata trasera y dificultades ambulatorias. Excepto en el grupo tratado con 2xCon4(c) (que se trató desde el día 1 después de la inmunización), se proporcionaron tratamientos en forma de inyecciones subcutáneas diarias comenzando el día 9 después de la inmunización (antes de la aparición de artritis) y continuando a lo largo del día 18.

50 Control clínico de la artritis de adyuvante

El avance de la inflamación se determinó clínicamente mediante la medición intermitente del volumen de la pata trasera usando plethysmografía en agua de conformidad con los procedimientos descritos por Feige et al, *Cellular Molec Life Sci.*, 57:1457-1470 (2000). La inhibición de la inflamación de la pata trasera se calculó basándose en el

área bajo la curva (AUC) usando la regla trapezoidal de conformidad con la fórmula:

$$[1 - \{(AdA \text{ tratado}) - \text{normal} / AdA \text{ sin tratar -normal}\}] \times 100$$

Además, se determinó el peso corporal total diario durante el régimen de tratamiento de 9 días como un punto final complementario debido a que se ha mostrado que la pérdida de peso corporal establece un paralelismo con la progresión de la inflamación de las articulaciones en este modelo de artritis. El día 18 se sacrificaron los animales en CO<sub>2</sub>.

La pérdida de densidad mineral ósea (DMO) se examinó en la necropsia (día 18 después de la inmunización). Se retiraron las patas traseras en la línea de pelo (próximo al tobillo (articulación)), sumergido en 70% de etanol, y después se monitorearon en orientación horizontal usando un densímetro de rayos X de haz de ventilación (Modelo QDR-4500A; Hologic, Waltham, MA). Véase Feige et al, supra. Después del monitoreo, una caja rectangular (29 x 25 mm) centrada se colocó en el calcáneo para delinear el sitio a ser analizado y los algoritmos patentados (software Hologic) calcularon el área de hueso, el contenido mineral óseo, y la densidad mineral ósea.

Todos los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar. Se utilizó un valor p de 0,05 para delinear las diferencias significativas entre los grupos. Se realizaron los ensayos de Krushal-Wallis ANOVA y Mann-Whitney U usando un software estadístico comercial (Statsoft v3.0; Statsoft, Tulsa, OK) con los datos clínicos (variables continuas).

Los resultados se muestran en las Figuras 11a, 11b, and 11c, respectivamente.

#### Ejemplo 21

Modelo de angiogénesis de córnea

#### 20 Efecto de CON4(C) sobre angiogénesis inducida por VEGF en ratas

Se evaluó el pepticuerpo de Ang-2 CON4(C) en el modelo de angiogénesis de cornea en ratas. Se indujo angiogénesis mediante el implante de un disco de nylon sumergido en VEGF- (o control BSA) en el estroma corneal (n = 8/grupo). Se administró el pepticuerpo TN8CON4-C mediante inyección subcutánea a 1,0 o 0,1 mg/rata/día durante siete días. Los otros dos grupos de animales se trataron con la misma dosis de pepticuerpo de control negativo 4883. Todos los grupos se trataron previamente con una sola dosis de carga de 3,0 o 0,3 mg que tenía tres veces la dosis de mantenimiento de 1,0 o 0,1 mg (véase la figura). Después de siete días de tratamiento, se determinaron dos puntos finales vasculares a partir de cada imagen digital de la córnea de rata: el número de vasos que intersectan el punto medio entre el disco y el limbo, y el área de vasos sanguíneos. El tratamiento con TN8CON4-C inhibió de manera significativa la angiogénesis inducida por VEGF de una manera dependiente de la dosis (p < 0,04), mientras que el tratamiento con el control de pepticuerpo no tuvo efecto significativo sobre cualquier punto final. No hubo prueba de toxicidad excesiva basada en los pesos corporales de los animales tratados. Los resultados se muestran en la Figura 12.

#### Ejemplo 22

Mapeo de epítopos

35 Se clonaron proteínas de Ang-2 (hAng-2) humanas de longitud completa (aminoácidos 1 - 495), N-terminal (aminoácidos 1 - 254) y C-terminal (aminoácidos 255-495) en un vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV -con etiquetas C-terminal 6xHis. Las tres construcciones resultantes más un control de vector se expresaron de manera transitoria en las células 293T. Se recogió el medio acondicionado de las células transfectadas y el nivel de expresión de Ang-2 en el medio se estimó mediante ELISA de anti-6xhis y transferencia de Western.

40 El epítopo de enlace de anticuerpos y pepticuerpos de anti-Ang-2 se determinó por su capacidad de unir las tres versiones de hAng-2 humano mediante ELISA de conformidad con el siguiente protocolo: una placa de ensayo de enlace alto de 96 pocillos se revistió con 100 µl de medio acondicionado por pocillo, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se aspiró el medio acondicionado y se bloqueó la placa con 200 µl por pocillo de 5% de BSA en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de bloqueo se aspiró. Se añadieron 100 µl por pocillo de anticuerpo, pepticuerpo, o Tie2-Fc a 1 µg/ml en un 1% de BSA en PBS, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron 4 veces con 200 µl de 0,1% de Tween en PBS. Se añadieron 100 µl por pocillo de IgG de cabra antihumana o IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP, y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Los pocillos se lavaron 4 veces con 200 µl de 0,1% de Tween en PBS. Posteriormente se añadieron 100 µl por pocillo de sustrato de TMB. Se leyó la O.D. a 370 nm

50 Los resultados se muestran en las Figuras 13a, 13b y 13c.

#### Ejemplo 23

Debido a ciertas limitaciones de sensibilidad inherentes en el ensayo de BiaCore, también se evaluó la afinidad de unión usando un ensayo Sepidyne KinExA

La unión de 2xCON4-C (Pb5714) a huAng-2 se ensayó sobre KinExA (Sapidyne, Boise, ID). Las perlas Reacti-Gel 6x (Pierce, Rockford, IL) se revistieron previamente con huAng-2 y se bloquearon con BSA. Las muestras de 2xCON4-C de 10 pM y 30 pM se incubaron con diversas concentraciones (0,3 pM - 3 nM) de huAng-2 a temperatura ambiente durante 8 horas antes del desarrollo a través de perlas revestidas con huAng-2. La cantidad de pepticuerpo unido a las perlas se cuantificó mediante anticuerpo Fc de cabra anti-humano marcado con (Cy5) fluorescente (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). La señal de enlace es proporcional a la concentración del pepticuerpo libre en equilibrio.

5 La constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) se obtuvo a partir de la regresión lineal de las curvas de competición usando un modelo de enlace homogéneo de un sitio de curva dual (software KinEx™). Posteriormente se determinó 10 que la  $K_D$  era de aproximadamente 2 pM para el enlace de 2xCON4-C con huAng-2.

Como se muestra en la figura 14, usando el pepticuerpo 2xCon4 de ensayo de KinExA se mostró que tenía -2 pM de 15 afinidad para hAng-2.

#### Ejemplo 24

##### Péptidos PEGilados

15 El péptido L1-7 se sintetizó con un sintetizador 431 ABI utilizando un protocolo de acoplamiento estándar y doble acoplamiento del residuo 14 (met) al residuo 1 N-terminal (Cys), numerando desde el terminal N al terminal C.

Conjugación de péptido L1-7 con Metoxi-poli(etilenglicol)-maleimida; MW: 5 KDa: denominado rnPEG5K-(Péptido L1-7)

20 Una solución de 0,8 mg de péptido L1-7 en 400  $\mu$ l de tampón 1 (20 mM de fosfato, 5 mM de EDTA, pH 6,5) se trató con 13,5 mg de metoxi-poli(etilenglicol)-maleimida (MW = 5 KDa; Shearwater Corp.); 0,27 ml de una solución de 50,0 mg/ml en tampón 1. La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante toda una noche, después se diluyó con 1,6 ml de tampón A (20 mM de Tris clorhidrato, pH 7,2) y se dializó en un módulo Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) frente al mismo tampón. La mezcla de reacción dializada se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico 25 sobre una columna de 1,0 ml HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). El pico de producto se eluyó en dos fracciones de 1,0 ml mediante un gradiente entre 100% de tampón A y 100% de tampón B (tampón A + NaCl 0,5M) sobre 40 volúmenes de columna. Las fracciones de producto combinadas se concentraron hasta 250  $\mu$ l que contenía 0,23 mg de proteína/ml con un dispositivo de Microsep 1 K Centrifugal (Pall Life Sciences).

Conjugación de péptido L1-7 con 1,11-bis-maleimidotetraetilenglicol; denominado PEO4(Péptido L1-7)2

30 Una solución de 1,0 mg de péptido L1-7 en 500  $\mu$ l de tampón 1 (20 mM de fosfato, 5 mM de EDTA, pH 6,5) se trató con 0,0375 mg de 1,11-bis-maleimidotetraetilenglicol (Pierce) (0,375 ml de una solución de 0,1 mg/ml en tampón 1). La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante 3,33 horas, después se dializó en un módulo Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) contra tampón A (20 mM de Tris clorhidrato, pH 7,2). La mezcla de reacción dializada se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico sobre una columna de 1,0 ml de HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). El pico de producto dimérico se eluyó en tres fracciones de 1,0 ml mediante un gradiente entre 35 100% de tampón A y 100% de tampón B (tampón A + NaCl 0,5 M) sobre 40 volúmenes de columna. Las fracciones de producto combinadas se concentraron hasta 550  $\mu$ l que contenía 0,12 mg de proteína/ml con un dispositivo de Microsep 1 K Centrifugal (Pall Life Sciences).

Conjugación de péptido L1-7 con poli(etilenglicol)bis-maleimida: MW 3,4 KDa: denominado PEG3.4K(Péptido L1-7) 2

40 Una solución de 3,0 mg de péptido L1-7 en 1,5 de tampón 1 (20 mM de fosfato, 5 mM de EDTA, pH 6,5) se trató con 1,125 mg de poli(etilenglicol)bis-maleimida (MW=5 KDa; Shearwater Corp.); 0,563 ml de una solución de 2,0 mg/ml en tampón 1. La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante toda una noche, después se diluyó en un módulo Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) contra tampón A (20 mM de Tris clorhidrato, pH 7,2). La mezcla de reacción dializada se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico sobre una columna de 5,0 ml HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). El pico de producto se eluyó en tres fracciones de 3,0 ml mediante un gradiente entre 100% de tampón A y 100% de tampón B (tampón A + NaCl 0,5 M) sobre 40 volúmenes de columna. Las fracciones de producto combinadas se concentraron hasta 850 $\mu$ l que contenía 0,24 mg de proteína/ml con dos dispositivos de Microsep 1 K Centrifugal (Pall Life Sciences).

45 Los resultados de la espectrometría de masa MALDI-TOF fueron los siguientes:

Nº de muestra	Identidad	Exp. MS	Obs. MS
1	L1-7 (péptido no PEGilado)	3,545	3.538,7
2	mPEG5K-(péptido L1-7)	8,500	8.851
3	PEO4(péptido L1-7)2	7,443	7.446,29

Nº de muestra	Identidad	Exp. MS	Obs. MS
4	PEG3.4K(péptido L1-7)2	10,550	10.552 6.882,61 3.550,13

Se apreciará que el subíndice "2" para PEG3.4K (péptido L1-7) y PEO4 (péptido L1-7) indica que hay dos péptidos por cada cadena de polímero, uno ubicado en cada extremo del polímero.

Determinación de IC<sub>50</sub>

5 Se determinó IC<sub>50</sub> para la inhibición de la interacción hAng2:hTie2-Fc para los péptidos PEGilados y libres de L1-7 mediante ELISA de neutralización como se describe en el Ejemplo 2. Para ELISA de neutralización, se prepararon las placas de microtitulación a las que el polipéptido de Ang-2 humano está enlazado, como se describe en el Ejemplo 2 para ELISA de afinidad. Los péptidos libres y PEGilados anti-Ang-2 L1-7 candidatas se tritieron de 100nM a 0,2pM en 4 diluciones en una solución de PBS que contiene aproximadamente 1% de BSA y aproximadamente 1nM de Tie-2 (proporcionado como una molécula Tie-2-Fc donde la porción de Tie-2 contiene únicamente la porción extracelular soluble de la molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Posteriormente, se agregaron aproximadamente 100 microlitros de la solución anticuerpo/Tie-2 a cada pocillo; las placas se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente, y se lavaron cinco veces en PBS que contenía aproximadamente 0,1% de Tween-20. Después del lavado, se agregaron aproximadamente 100 microlitros por pocillo de anticuerpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., número de catálogo 557039) en una concentración final de aproximadamente 1 microgramo por ml. Y las placas se incubaron por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Aproximadamente 100 microlitros por pocillo de IgG-HRP de cabra anti-ratón Pierce Chemical CO., número de catálogo 31432) se agregaron en una dilución de 1:10.000 en PBS que contenía 1% de BSA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora, después de lo cual se lavaron cinco veces con PBS que contenía aproximadamente 0,1% de Tween-20. Aproximadamente 100 microlitros por pocillo de sustrato TMB (descrito anteriormente) se agregaron y se desarrolló color. La absorbancia se leyó posteriormente en un espectómetro a 370nm.

10

15

20

25 Los péptidos L1-7 (C-GGGGG-AQ-TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG-LE) (SEQ ID NO: 359) incluyeron: cisteína N-terminal para acoplarse a PEG; y un enlazador 5Gly. Las secuencias flanqueadoras AQ y LE estuvieron presentes tanto en el clon de fago original y en el pepticuerpo. Los resultados de IC<sub>50</sub> de inhibición hAng-2:Tie2 fueron los siguientes:

Péptido	IC <sub>50</sub> (nM)
Péptido L1-7	0,49
mPEG5K-(Péptido L1-7)	11,7
PEO4(Péptido L1-7)2	0,064
PEG3.4K(Péptido L1-7)2	0,058

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> OLINER, JONATHAN DANIEL  
 MIN, HOSUNG  
 <120> AGENTES DE UNIÓN ESPECÍFICOS DE LA ANGIOPOIETINA-2 HUMANA  
 5 <130> A-801B  
 <140> 10/269.695  
 <141> 10-10-2002  
 <150> US 60/414.155  
 <151> 27-09-2002  
 10 <150> US 60/328.624  
 <151> 11-10-2001  
 <160> 359  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 15 <210> 1  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptidos de unión Ang-2  
 20 <400> 1  
  
 Lys Arg Pro Cys Glu Glu Met Trp Gly Gly Cys Asn Tyr Asp  
 1 5 10  
  
 <210> 2  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptidos de unión Ang-2  
 <400> 2  
  
 His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Trp  
 1 5 10  
  
 30 <210> 3  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Polipéptido de unión Ang-2  
 <400> 3  
  
 Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln  
 1 5 10  
  
 <210> 4  
 <211> 14  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido de unión Ang-2

<400> 4

**Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met**  
 1 5 10

5 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polipéptido de unión Ang-2

<400> 5

**Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp**  
 1 5 10 15

10 **Asn His**

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido de unión Ang-2

<400> 6

**Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe**  
 1 5 10 15

20 **Thr Phe Gln Gln**  
 20

<210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptidos de unión Ang-2

25 <400> 7

**Gln Tyr Gly Cys Asp Gly Phe Leu Tyr Gly Cys Met Ile Asn**  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 67  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido

<400> 8

acaaaacaaac atatgggtgc acagaaagcg gccgcaaaaa aactcgaggg tggaggcggt 60  
 ggggaca 67

35 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido  
 <400> 9  
 ggtcattact ggacccgatc 20  
 5 <210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 10 <400> 10  
 cgtacagggt tacgcaagaa aatgg 25  
 <210> 11  
 <211> 66  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 <400> 11  
**tttgttggat ccattactcg agtttttttgc cggccgcttt ctgtgcacca ccacacctccac** 60  
**ctttac** 66  
 20 <210> 12  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (32)..(32)  
 <223> Xaa = Fc  
 30 <400> 12  
 Met Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa  
 20 25 30  
 <210> 13  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 40 <222> (29)..(29)  
 <223> Xaa = Fc  
 <400> 13

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa  
 20 25

<210> 14

<211> 51

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (51)..(51)

<223> xaa = Fc

<400> 14

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser  
 20 25 30

Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly  
 35 40 45

Gly Gly Xaa  
 50

15 <210> 15

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (60)..(60)

<223> Xaa = Fc

<400> 15

Met Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu  
 1 5 10 15

Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 20 25 30

25 Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe  
 35 40 45

Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa  
 50 55 60

<210> 16

<211> 56

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 5 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (56)..(56)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 16

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro  
 20 25 30

Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln  
 35 40 45

Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa  
 50 55

10 <210> 17  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

15 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (26)..(26)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 17

Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu  
 1 5 10 15

20 His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa  
 20 25

<210> 18  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (45)..(45)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 18

Met Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly  
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser  
 20 25 30

Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly xaa  
 35 40 45

<210> 19

<211> 62

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> C62)..(62)

<223> Xaa = Fc

<400> 19

Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu  
 1 5 10 15

His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro  
 35 40 45

Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly xaa  
 50 55 60

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 20

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu  
 20 25 30

<210> 21

<211> 53

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

30 <220>

5 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Fc  
 <400> 21  
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys  
 20 25 30  
 Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr  
 35 40 45  
 Phe Gln Gln Leu Glu  
 50  
 10 <210> 22  
 <211> 59  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2  
 15 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Fc  
 <400> 22  
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly  
 20 25 30  
 Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr  
 35 40 45  
 Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu  
 50 55  
 20 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2)..(2)  
 30 <223> Xaa = Fc  
 <400> 23

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp  
 1 5 10 15

Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu  
 20 25

<210> 24  
 <211> 47

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 24

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln  
 20 25 30

Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu  
 35 40 45

<210> 25  
 <211> 61

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

20 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 25

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp  
 1 5 10 15

Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser  
 20 25 30

Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu  
 35 40 45

Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu  
 50 55 60

<210> 26

<211> 75

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

5 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (75)..(75)  
 <223> Xaa = Fc  
 <400> 26

Met Gly Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu  
 20 25 30

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly  
 35 40 45

Ser Ala Thr Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser  
 50 55 60

Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly xaa  
 65 70 75

10 <210> 27  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

15 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 27

Met xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys  
 20 25 30

Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr  
 35 40 45

Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro  
 50 55 60

20 Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu  
 65 70

<210> 28  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (30)..(30)  
 <223> Xaa = Fc

5 <400> 28

Met Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr  
 1 5 10 15

Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa  
 20 25 30

<210> 29  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 15 <222> (26)..(26)  
 <223> xaa = Fc

<400> 29

Met Gly Ala Gln Gln Tyr Gly Cys Asp Gly Phe Leu Tyr Gly Cys Met  
 1 5 10 15

Ile Asn Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa  
 20 25

<210> 30  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 25 <222> (26)..(26)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 30

Met Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Met Trp Gly Gly Cys Asn  
 1 5 10 15

Tyr Asp Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa  
 20 25

<210> 31  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 35 <222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 31

Met Gly Ala Gln His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys  
1 5 10 15

His Trp Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa  
20 25

5 <210> 32

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpo capaz de unirse a Ang-2

10 <220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (26) .. (26)

<223> Xaa = Fc

<400> 32

Met Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr  
1 5 10 15

Tyr Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Xaa  
20 25

15

<210> 33

<211> 784

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2

<400> 33

atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc 60

actttccagc agctcgaggg tggaggcggt ggggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc 120

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtttccctct tccccccaaa acccaaggac 180

accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa 240

gaccctgagg tcaagttcaa ctgg tacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 300

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtccctg 360

caccaggact ggctgaatgg caaggagtagc aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 420

gccccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 480

accctgcccc catcccgga tggactgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 540

aaaggcttct atcccagcga catgccgtg gagtggaga gcaatggca gccggagaac 600

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttcctt ctacagcaag 660

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACgtct tctcatgctc cgtgatgcat 720

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tggctccggg taaataatgg 780

atcc 784

<210> 34  
 <211> 768  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2  
 <400> 34

```

atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag      60
cagctcgagg gtggaggcgg tggggacaaa actcacacat gtccaccttg cccagcacct    120
gaactcctgg ggggaccgtc agttttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg    180
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag    240
gtcaagttca actggtaacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg    300
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac    360
tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag gtctccaaca aagccctccc agccccatc    420
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc    480
ccatcccgaa atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc    540
tatcccagcg acatcgccgt ggagtggag agcaatggc agccggagaa caactacaag    600
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg    660
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg    720
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaataa                  768
  
```

10 <210> 35  
 <211> 834  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2

15 <400> 35

```

atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag      60
cagggatccg gttctgctac tgggtgttcc ggctccaccg caagctctgg ttcaggcagt    120
gcgactcatc tcgagggtgg aggcgggtgg gacaaaactc acacatgtcc accttgccca    180
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtt ttccctttcc ccccaaaacc caaggacacc    240
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtgg tggacgtgag ccacgaagac    300
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag    360
ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac    420
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccgacc    480
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc    540
ctgccccat cccggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa    600
ggcttctatc ccagcgacat cggcgtggag tgggagagca atggcagcc ggagaacaac    660
tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc    720
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag    780
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccggtaa ataa                  834
  
```

<210> 36  
 <211> 861  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2

<400> 36

atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc 60  
 actttccagc agggtggtgg tggtggtggc ggtggtaagt tcaacccact ggatgagctg 120  
 gaagagactc tgtatgaaca gttcactttc cagcaactcg agggtgaggc cggtggggac 180  
 aaaactcaca catgtccacc ttgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtttc 240  
 ctcttccccca caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 300  
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 360  
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 420  
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 480  
 aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 540  
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatcccc gggatgagct gaccaagaac 600  
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg 660  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 720  
 ggctcccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 780  
 gtcttctcat gctccgtat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 840  
 tccctgtctc cgggtaaata a 861

10 <210> 37  
 <211> 849  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2

<400> 37

	atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag	60
	caggggtggtg gtgggtggcg tggttaagttc aacccactgg atgagctgga agagactctg	120
	tatgaacagt tcactttcca gcaactcgag ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca	180
	tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtttcctt cttccccca	240
	aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac	300
	gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	360
	aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	420
	ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaaac	480
	aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggcga gccccgagaa	540
	ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg	600
	acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	660
	cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcccttcttc	720
	ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	780
	tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	840
	ggtaaataaa	849
	<210> 38	
	<211> 759	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2	
	<400> 38	
	atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacccatgga cttgcgaaca catgctcgag	60
	gggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg	120
	gggggaccgt cagtttcctt cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg	180
	accctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240
	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	300
	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	420
	atctccaaag ccaaaggcga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg	480
	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
	gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
	cccggtgctgg actccgacgg ctcccttcttc ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc	660
	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	720
	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataaa	759
10	<210> 39	
	<211> 816	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2	

<400>	39	
		atgcaggaag aatgcgaatg ggacccatgg acttgcgaac acatgggatc cggttctgct 60
		actggtggtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca tctcgagggt 120
		ggagggcggtg gggacaaaac tcacacatgt ccacccatgcc cagcacctga actcctgggg 180
		ggaccgtcag tttccctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 240
		cctgaggtca catgcgttgt ggtggacgtg agccacaag accctgaggt caagttcaac 300
		tgttacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagttac 360
		aacagcacgt accgtgttgtt cagcgtcctc accgtctgc accaggactg gctgaatggc 420
		aaggagtaca agtgcaaggt ctccaaacaaa gcccctccag ccccccattcgaa gaaaaccatc 480
		tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccccc atcccggat 540
		gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggta aaggcttcta tcccagcgcac 600
		atcgccgtgg agtgggagag caatggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 660
		gtgctggact ccgacggctc cttttccctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 720
		tggcagcagg ggaacgttctt ctcatgctcc gtgtatgcattt aggtctgtca caaccactac 780
		acgcagaaga gcccctccct gtctccgggt aaataaa 816
<210>	40	
5 <211>	867	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2	
10 <400>	40	
		atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacccatggc cttgcgaaca catgggatcc 60
		ggttctgcta ctggtggttc cggctccacc gcaagctctg gttcaggcag tgcgactcat 120
		caggaagaat gcaatggga cccatggact tgcgaacaca tgctcgagggt tggaggcgg 180
		ggggacaaaac ctcacacatg tccacccatgc ccagcacctg aactccctggg gggaccgtca 240
		gttttcctt tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgagggtc 300
		acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 360
		gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcagc 420
		taccgtgtgg tcagcgtcctt caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagttac 480
		aagtgcagaagg tctccaaacaaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 540
		aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccccc catccggga tgagctgacc 600
		aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttctt atcccagcga catgcgtgg 660
		gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac 720
		tccgacggct cttttccctc tacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 780
		gggaacgtctt tctcatgctc cgtgtatgcattt gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 840
		agccctccccc tggctccggg taaataaa 867
<210>	41	
<211>	774	
<212>	ADN	
15 <213>	Secuencia Artificial	

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2

&lt;400&gt; 41

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60
gttttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	120
acatgcgtgg tggggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag	300
aagtgcacgg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
tccgacggct cttcttcctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	600
ggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	660
agccctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagaaatt caaccgcgtg	720
gacgagctgg aagagactct gtacgaacag tttacttttc aacagctcga gtaa	774

5 &lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 840

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2

&lt;400&gt; 42

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60
gttttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	120
acatgcgtgg tggggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag	300
aagtgcacgg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
tccgacggct cttcttcctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	600
ggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	660
agccctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagggatc cggttctgt	720
actgggtgtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca taaattcaac	780
ccgctggacg aactggaaaga aactctgtac gaacagttca cttccagca actcgagtaa	840

15 &lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 858

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2  
 <400> 43

```

atggacaaaa ctcacacatg tccacacctgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      60
gtttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc      120
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      300
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc      360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgaa tgagctgacc      420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgcccgtg      480
gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      540
tccgacggct cttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag      600
ggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag      660
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagaaatt caaccgcgtg      720
gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag ttcaacttcc agcagggtgg tgggtgggt      780
ggcgggtggta agttcaaccc actggatgag ctggaagaga ctctgtatga acagttcact      840
ttccagcaac tcgagtaa                                         858

```

5 <210> 44  
 <211> 756  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2  
 <400> 44

```

atggacaaaa ctcacacatg tccacacctgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      60
gtttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc      120
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      300
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc      360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgaa tgagctgacc      420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgcccgtg      480
gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      540
tccgacggct cttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag      600
ggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag      660
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagcagga agaatgcgaa      720
tgggacccat ggacttgcga acacatgctc gagtaa                                         756

```

15 <210> 45  
 <211> 822  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2  
 <400> 45

atggacaaaa ctcacacatg tccacacctgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60  
 gttttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 120  
 acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180  
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240  
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag 300  
 aagtgcacgg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 360  
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 420  
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgcccgtg 480  
 gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540  
 tccgacggct ctttcttcctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600  
 5 gggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660  
 agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagggatc cggttctgct 720  
 actgggtgtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca tcaggaagaa 780  
 tgcaatggg acccatggac ttgcgaacac atgctcgagt aa 822

<210> 46  
 <211> 864  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2  
 <400> 46

atggacaaaa ctcacacatg tccacacctgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60  
 gttttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 120  
 acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180  
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240  
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag 300  
 aagtgcacgg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 360  
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 420  
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgcccgtg 480  
 gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540  
 tccgacggct ctttcttcctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600  
 gggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660  
 agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagggatc agaatgcgaa 720  
 tgggaccat ggacttgcga acacatggga tccgggtctg ctactggtgg ttccggctcc 780  
 accgcaagct ctggttcagg cagcgcgact catcaggaa aatgcgaatg ggaccatgg 840  
 acttgcgaac acatgctcga gtaa 864

<210> 47  
 <211> 906  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2  
 <400> 47

```

atgggtgcac aggaagaatg cgaatggac ccatggactt gcgaacacat gggtggttgt 60
ggtgtggcg gtggtaaatt caacccgctg gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag 120
ttcactttcc agcagggatc cggttctgct actgggtt ccggctccac cgcaagctct 180
ggttcaggca gtgcgactca tctcgagggt ggaggcggtg gggacaaaac tcacacatgt 240
ccaccttgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag ttttcctctt ccccccaaaa 300
cccaaggaca ccctcatgtat ctcccggacc cctgaggta catgcgttgt ggtggacgtg 360
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacggtt acggcgttgg agtgcataat 420
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgttgttgg cagcgtcctc 480
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaggt ctccaacaaa 540
gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggcagcc ccgagaacca 600
caggtgtaca ccctgcccccc atcccggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 660
tgcctggta aaggcttcta tcccagcgac atcgcgttgtt agtggagag caatggcag 720
ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc ctttttcctc 780
tacagcaagc tcaccgttgg acaagacgg tggcagcagg ggaacgttgg ctcatgttcc 840
gtgatgtatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gccttcctt gtctccgggt 900
aaataaa 906
  
```

10 <210> 48  
 <211> 897  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2

15 <400> 48

```

atggacaaaa ctcacacatg tccacattgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60
gttttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgagggtc 120
acatgcgtgg tggtacggtt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacggt 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggaggatca acacagcacg 240
taccgtgtgg tcagcgttctt caccgttctg caccaggact ggctgaatgg caaggagttac 300
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 360
aaagggcagg cccgagaacc acagggttac accctggggc catccggga tgagctgacc 420
aagaaccagg tcagcgttac ctgcctggtc aaaggcttctt atcccagcga catgcgttgt 480
gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
tccgacggct ctttttcctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagacggat gtggcagcag 600
  
```

g g g a a c g t c t	t c t c a t g c t c	c g t g a t g c a t	g a g g c t c t g c	a c a a c c a c t a	c a c g c a g a a g	660	
a g c c t c t c c c	t g t c t c c g g g	t a a a g g t g g a	g g t g g t g g t g	c a c a g g g a t c	c g g t t c t g c t	720	
a c t g g t g g t t	c c g g c t c c a c	c g c a a g c t c t	g g t t c a g g c a	g t g c g a c t c a	t a a a t t c a a c	780	
c c g c t g g a c g	a a c t g g a a g a	a a c t c t g t a c	g a a c a g t t c a	c t t t c a g g c a	g g g t g g t g g c	840	
g g t g g t c a g g	a a g a a t g c g a	a t g g g a c c c a	t g g a c t t g c g	a a c a c a t g c t	c g a g t a a	897	
<210>	49						
<211>	771						
<212>	ADN						
5	<213>	Secuencia Artificial					
	<220>						
	<223>	Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2					
	<400>	49					
	a t g g g t g c a c	a g t t c g a c t a	c t g c g a a g g t	g t t g a a g a c c	c g t t c a c t t t	c g g t t g c g a c	60
	a a c c a c c t c g	a g g g t g g a g g	c g g t g g g g a c	a a a a c t c a c a	c a t g t c c a c c	t t g c c c a g c a	120
	c c t g a a c t c c	t g g g g g g a c c	g t c a g t t t t c	c t c t t c c c c c	c a a a a c c c a a	g g a c a c c c t c	180
	a t g a t c t c c c	g g a c c c c t g a	g g t c a c a t g c	g t g g t g g t g g	a c g t g a g c c a	c g a a g a c c c t	240
	g a g g t c a a g t	t c a a c t g g t a	c g t g g a c g g c	g t g g a g g t g c	a t a a t g c c a a	g a c a a a g c c g	300
	c g g g a g g a g c	a g t a c a a c a g	c a c g t a c c g t	g t g g t c a g c g	t c c t c a c c g t	c c t g c a c c a g	360
	g a c t g g c t g a	a t g g c a a g g a	g t a c a a g t g c	a a g g t c t c c a	a c a a a g c c c t	c c c a g g c c c c	420
	a t c g a g a a a a	c c a t c t c c a a	a g c c a a a g g g	c a g c c c c g a g	a a c c a c a g g t	g t a c a c c c t g	480
	c c c c c a t c c c	g g g a t g a g c t	g a c c a a g a a c	c a g g t c a g c c	t g a c c t g c c t	g g t c a a a g g c	540
	t t c t a t c c c a	g c g a c a t c g c	c g t g g a g t g g	g a g a g c a a t g	g g c a g c c g g a	g a a c a a c t a c	600
	a a g a c c a c g c	c t c c c g t g c t	g g a c t c c g a c	g g c t c c t t c t	t c c t c t a c a g	c a a g c t c a c c	660
	g t g g a c a a g a	g c a g g t g g c a	g c a g g g g a a c	g t c t t c t c a t	g c t c c g t g a t	g c a t g a g g c t	720
	c t g c a c a a c c	a c t a c a c g c a	g a a g a g c c t c	t c c c t g t c t c	c g g g t a a a t a a	a	771
10	<210>	50					
	<211>	759					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia Artificial					
	<220>						
15	<223>	Pepticuerpos que codifican ADN capaz de unirse a Ang-2					
	<400>	50					

	atgggtgcac agcagtacgg ttgcgacgg tttctgtacg gttgcacatgat caaccccgag	60
	ggtgtggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccaccc gcccaggcacc tgaactccctg	120
	gggggaccgt cagtttcct cttccccc aaacccaagg acaccctcat gatctcccg	180
	acccctgagg tcacatgcgt ggtggtgac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240
	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg gggaggcag	300
	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccc catcgaaaacc	420
	atctccaaag ccaaaggcgac gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgccc cccatcccg	480
	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccg	540
	gacatcgccg tggagtggg gagaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgc	600
	cccggtctgg actccgacgg ctcccttcc ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc	660
	aggtggcgc aggggaacgt cttctcatgc tccgtatgc atgaggctct gcacaaccac	720
	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa	759
	<210> 51	
	<211> 759	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2	
	<400> 51	
	atgggtgcac agaaacgccc atgcgaagaa atgtgggtg gttgcaacta cgaccctcgag	60
	ggtgtggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccaccc gcccaggcacc tgaactccctg	120
	gggggaccgt cagtttcct cttccccc aaacccaagg acaccctcat gatctcccg	180
	acccctgagg tcacatgcgt ggtggtgac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240
	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg gggaggcag	300
	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccc catcgaaaacc	420
	atctccaaag ccaaaggcgac gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgccc cccatcccg	480
	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccg	540
	gacatcgccg tggagtggg gagaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgc	600
	cccggtctgg actccgacgg ctcccttcc ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc	660
	aggtggcgc aggggaacgt cttctcatgc tccgtatgc atgaggctct gcacaaccac	720
	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa	759
10	<210> 52	
	<211> 759	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2	
	<400> 52	

	atgggtgcac agcaccagat ctgcaaatgg gacccgtgga cctgcaaaca ctggctcgag	60
	ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg	120
	gggggaccgt cagtttcctt cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctccgg	180
	acccctgagg tcacatgcgt ggtggtgac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240
	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	300
	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	420
	atctccaaag ccaaaggcga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgccc cccatcccgg	480
	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
	gacatcgccg tggagtgaa gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
	cccggtctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	660
	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtatgc atgaggctct gcacaaccac	720
	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataaa	759
	<210> 53	
	<211> 759	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Pepticuerpos que codifican ADN capaces de unirse a Ang-2	
	<400> 53	
	atgggtgcac agaaacgtcc atgcgaagaa atttcggtg gttgcaccta ccagctcgag	60
	ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg	120
	gggggaccgt cagtttcctt cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctccgg	180
	acccctgagg tcacatgcgt ggtggtgac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240
	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	300
	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	420
	atctccaaag ccaaaggcga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgccc cccatcccgg	480
	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
	gacatcgccg tggagtgaa gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
	cccggtctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	660
	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtatgc atgaggctct gcacaaccac	720
10	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataaa	759
	<210> 54	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 54	
	cggcgcaact atcggtatca agctg	25
	<210> 55	

<211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 <400> 55  
 catgtaccgt aacactgagt ttgcgc 26  
 <210> 56  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Motivos de consenso generados a partir de la genoteca TN8-IX  
 <220>  
 15 <221> característica\_misclánea  
 <222> (7, 12 y)..(14)  
 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido de origen natural.  
 <400> 56  
 Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Trp Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa  
 1 5 10  
 20 <210> 57  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Motivos de consenso generados a partir de la genoteca TN8-IX  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (7, 12 y)..(14)  
 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido de origen natural.  
 30 <400> 57  
 Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Phe Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa  
 1 5 10  
 <210> 58  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Motivos de consenso generados a partir de la genoteca TN8-IX  
 <220>  
 40 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1, 2, 3, 5 y)..(13)  
 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido de origen natural.  
 <400> 58  
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Xaa Met  
 1 5 10  
 45 <210> 59  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Motivos de consenso generados a partir de la genoteca TN12-I

5 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (3, 8, 10-14 y)..(18)  
 <223> Xaa se refiere a cualquier aminoácido de origen natural.

<400> 59

Trp Ser Xaa Cys Ala Trp Phe Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Arg  
 1 5 10 15

Arg Xaa

10 <210> 60  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Fc IgG1 humana

<400> 60

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly Lys  
 225

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Motivos de consenso generados a partir de la genoteca TN8-IX

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (1-3, 5, 7, 12, 13 y..(14)

<223> xaa se refiere a cualquier aminoácido de origen natural.

<400> 61

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Tyr Trp Tyr Cys Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>



<400> 66

**Trp Asp Pro Trp Thr Cys**  
1 5

<210> 67

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<220>

10 <221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> xaa es un residuo de aminoácido polar neutro ácido

<400> 67

**Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr**  
1 5

15 <210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> xaa es un residuo de aminoácido polar neutro o ácido

25 <400> 68

**Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys**  
1 5

<210> 69

<211> 14

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<220>

35 <221> característica\_misclánea

<222> (1, 2 y)..(3)

<223> xaa son cada uno unos residuos de aminoácidos independientes.

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (5)..(5)

40 <223> xaa es un residuo de aminoácido.

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (12)..(12)

<223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido.

45 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (13)..(13)

<223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (14)..(14)  
 <223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o polar neutro.

5 <400> 69

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 70  
 <211> 20

10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

15 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1 y)..(15)  
 <223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido.

20 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2 y)..(16)  
 <223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

25 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (3-6, 18, 19 y)..(20)  
 <223> xaa están cada uno independientemente ausentes o son unos residuos de aminoácidos.

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (8)..(8)  
 <223> xaa es un residuo de aminoácido.

30 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o polar neutro.

<400> 70

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa  
20

<210> 71  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2)..(2)  
 <223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro.

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (4)..(4)

- <223> xaa es A, D, o E.
- <220>
- 5 <221> característica\_misclánea
- <222> (6)..(6)
- <223> xaa es un residuo de aminoácido ácido.
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (7)..(7)
- <223> xaa es un residuo de aminoácido.
- 10 <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (B)..(8)
- <223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.
- <400> 71
- 15 **Pro Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Tyr**
- 1 5 10
- <210> 72
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (1, 4 y)..(20)
- 25 <223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido.
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (2, 15, 16 y)..(21)
- <223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido polar neutro, ácido o básico.
- 30 <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (3, 17 y)..(18)
- <223> xaa está ausente, o es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o polar neutro.
- <220>
- 35 <221> característica\_misclánea
- <222> (6)..(6)
- <223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro.
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- 40 <222> (8)..(8)
- <223> xaa es A, D, o E.
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (10)..(10)
- 45 <223> xaa es un residuo de aminoácido ácido.
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (11)..(11)
- <223> Xaa es un residuo de aminoácido.
- 50 <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (12)..(12)



<222> (7, 15 y)..(16)  
<223> xaa es un residuo de aminoácido polar neutro.

<220>  
<221> característica\_misclánea  
5 <222> (8)..(8)  
<223> xaa es un residuo de aminoácido ácido.

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (10 y)..(11)  
10 <223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro.

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (18)..(18)  
<223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o básico.

15 <400> 74

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 S 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa  
20

20 <210> 75  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-

25 <220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (2)..(2)  
<223> xaa es un residuo de aminoácido ácido;

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222>. (4)..(4)  
30 <223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro.

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (5)..(5)  
<223> xaa es E, D, o Q.

35 <220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (10)..(10)  
<223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o polar neutro.

40 <220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (13)..(13)  
<223> xaa es un residuo ácido.

<400> 75

Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys Xaa  
1 5 10

45 <210> 76  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

&lt;400&gt; 76

<b>Pro</b>	<b>Ile</b>	<b>Arg</b>	<b>Gln</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Cys</b>	<b>Asp</b>	<b>Trp</b>	<b>Asp</b>	<b>Pro</b>	<b>Trp</b>	<b>Thr</b>	<b>Cys</b>	<b>Glu</b>	<b>His</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>						<b>15</b>

<b>Met</b>	<b>Trp</b>	<b>Glu</b>	<b>Val</b>
			<b>20</b>

5 &lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

&lt;400&gt; 77

<b>Thr</b>	<b>Asn</b>	<b>Ile</b>	<b>Gln</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Cys</b>	<b>Glu</b>	<b>Trp</b>	<b>Asp</b>	<b>Pro</b>	<b>Trp</b>	<b>Thr</b>	<b>Cys</b>	<b>Asp</b>	<b>His</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>						<b>15</b>

<b>Met</b>	<b>Pro</b>	<b>Gly</b>	<b>Lys</b>
			<b>20</b>

15 &lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

&lt;400&gt; 78

<b>Trp</b>	<b>Tyr</b>	<b>Glu</b>	<b>Gln</b>	<b>Asp</b>	<b>Ala</b>	<b>Cys</b>	<b>Glu</b>	<b>Trp</b>	<b>Asp</b>	<b>Pro</b>	<b>Trp</b>	<b>Thr</b>	<b>Cys</b>	<b>Glu</b>	<b>His</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>						<b>15</b>

<b>Met</b>	<b>Ala</b>	<b>Glu</b>	<b>Val</b>
			<b>20</b>

20 &lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

25 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

&lt;400&gt; 79

<b>Asn</b>	<b>Arg</b>	<b>Leu</b>	<b>Gln</b>	<b>Glu</b>	<b>Val</b>	<b>Cys</b>	<b>Glu</b>	<b>Trp</b>	<b>Asp</b>	<b>Pro</b>	<b>Trp</b>	<b>Thr</b>	<b>Cys</b>	<b>Glu</b>	<b>His</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>						<b>15</b>

<b>Met</b>	<b>Glu</b>	<b>Asn</b>	<b>Val</b>
			<b>20</b>

30 &lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 80

**Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His**  
 1 5 10 15

**Met Pro Arg Ser**  
 20

<210> 81

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 81

**Leu Arg His Gln Glu Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His**  
 1 5 10 15

**Met Phe Asp Trp**  
 20

10

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 82

**Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His**  
 1 5 10 15

**Met Tyr Val Gly**  
 20

20 <210> 83

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

25 <400> 83

**Ser Ile Ser His Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His**  
 1 5 10 15

**Met Gln Val Gly**  
 20

30 <210> 84

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 84

Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Gly Arg Met  
 20

<210> 85

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 85

Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Gly Ser Thr  
 20

10 <210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 86

Gly His Ser Gln Glu Glu Cys Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Gly Thr Ser  
 20

20 <210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

25 <400> 87

Gln His Trp Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His  
 1 5 10 15

Met Pro Ser Lys  
 20

30 <210> 88

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 88

Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Pro Val Arg  
 20

<210> 89

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 89

Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Pro Arg Asn  
 20

<210> 90

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 90

Val Lys Thr Gln Glu His Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Arg Glu Trp  
 20

<210> 91

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

25 <400> 91

Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Leu Pro Met  
 20

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 92

Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Pro Pro Met  
 20

<210> 93  
 <211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 93

Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His  
 1 5 10 15

Met Asp Ile Lys  
 20

10 <210> 94

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 94

His Gly Gln Asn Met Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Phe Arg Tyr  
 20

20 <210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 95

Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Pro Leu Arg  
 20

25 <210> 96

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 96

Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Glu Ser Gln  
 20

<210> 97  
 <211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 97

Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His  
 1 5 10 15

Met Val Ser Ser  
 20

10 <210> 98  
 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 98

Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Leu Glu Gly Leu  
 20

20 <210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 99

Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His  
 1 5 10 15

Met Val Gly Leu  
 20

25 <210> 100

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 100

Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Val Arg Ser  
 20

<210> 101

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 101

Pro Met Asn Gln Val Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Pro Arg Ser  
 20

10 <210> 102

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 102

Phe Gly Trp Ser His Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Gly Ser Thr  
 20

20 <210> 103

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 103

Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

25 Met Val Gly Pro  
 20

<210> 104

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 104

Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His  
 1 5 10 15

Met Asp Gln Leu  
 20

5 <210> 105  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2  
 <400> 105  
 Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His  
 1 5 10 15

Met Gln Val Asp  
 20

10 <210> 106  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2  
 <400> 106

Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu  
 1 5 10 15

Leu Gln Gly Trp  
 20

20 <210> 107  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2  
 25 <400> 107  
 Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His  
 1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly  
 20

30 <210> 108  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2  
 <400> 108

Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His  
 1 5 10 15

Met Gln Gly Gly  
 20

<210> 109  
 <211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 109

Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His  
 1 5 10 15

Met Gln Ser Gly  
 20

10 <210> 110  
 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 110

Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His  
 1 5 10 15

Met Gln Gly Gly  
 20

20 <210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 111

Trp Val Asn Glu Val Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His  
 1 5 10 15

Trp Asp Thr Pro  
 20

25 <210> 112

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 112



Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His  
 1 5 10 15

Leu Thr Tyr Thr  
 20

<210> 117  
 <211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 117

Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr  
 1 5 10 15

Val Trp Pro Ser  
 20

10 <210> 118  
 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 118

Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His  
 1 5 10 15

Met Val Gln Gly  
 20

20 <210> 119  
 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 119

Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His  
 1 5 10 15

Phe Ile Phe His Tyr Thr  
 20

25 <210> 120  
 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 120

Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Ser  
 20

<210> 121

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 121

Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Gln  
 20

<210> 122

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 122

Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu His  
 1 5 10 15

Trp Met Phe Gln Gln Ala  
 20

20 <210> 123

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

25 <400> 123

Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Gln Thr Phe Gln Glu Arg  
 20

30 <210> 124

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 124

Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Phe Ile Leu Gln Gln Gly  
 20

<210> 125  
 <211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 125

Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Ala  
 20

10 <210> 126  
 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 126

Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Phe Met Leu Gln Gln Ala  
 20

20 <210> 127

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 127

Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr Leu Tyr Lys Gln  
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Gln His Ser  
 20

25 <210> 128

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 128

Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Val  
 20

<210> 129

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 129

Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr Leu Tyr Asn Gln  
 1 5 10 15

Trp Met Phe His Gln Arg  
 20

10 <210> 130

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 130

Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Phe Met Leu Gln His Gln  
 20

20 <210> 131

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 131

Gln Lys Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr Leu Tyr Asp Gln  
 1 5 10 15

Phe Met Leu Gln Gln Gly  
 20

25 <210> 132

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 132

Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Lys Gln  
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg  
 20

<210> 133

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 133

Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp Leu Tyr His Gln  
 1 5 10 15

Phe Thr Leu His His Gln  
 20

10 <210> 134

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 134

Gln Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Phe Met Phe Gln Gln Ser  
 20

20 <210> 135

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 135

Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Trp Ile Arg Arg Tyr His  
 20

25 <210> 136

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 136

Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln Leu Tyr Glu Gln  
 1 5 10 15

Phe Ile Leu Leu His Gly  
 20

<210> 137

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 137

His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Tyr Gln  
 1 5 10 15

Trp Leu Tyr Asp Gln Leu  
 20

10

<210> 138

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 138

Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Glu  
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Gln His Ala  
 20

20

<210> 139

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

25 <400> 139

Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His  
 1 5 10 15

Trp Ile Leu Gln His Ser  
 20

30

<210> 140

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 140

Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln

1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg  
20

<210> 141  
<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 141

Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln  
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg  
20

10 <210> 142  
<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>  
15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 142

Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln  
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg  
20

20 <210> 143  
<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 143

Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr  
1 5 10 15

Asp Val Gln Ala  
20

25 <210> 144  
<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 144

Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp  
 1 5 10 15

Arg Arg Cys Ile  
 20

<210> 145  
 <211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 145

Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr  
 1 5 10 15

Gln Arg Ile Val  
 20

10 <210> 146  
 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 146

Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln  
 1 5 10 15

Asn Leu Ala Leu  
 20

20 <210> 147  
 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 147

Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln  
 1 5 10 15

Leu Cys Pro Arg  
 20

25 <210> 148  
 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 148

Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys  
 1 5 10 15

Asp Trp Tyr Gly  
 20

<210> 149  
 <211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 149

Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys  
 1 5 10 15

Asp Lys Gln Thr  
 20

10 <210> 150  
 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 150

Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys  
 1 5 10 15

Asp Asn Gln Ser  
 20

20 <210> 151

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 151

Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Arg  
 20

25 <210> 152

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 152

Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Met Gln Lys  
 20

- 5 <210> 153  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 153

Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Asn Leu Asp  
 20

- 10 <210> 154  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 154

His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Tyr Gln Gly  
 20

- 20 <210> 155  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

25 <400> 155

Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys  
 1 5 10 15

Asp Lys Gln Met  
 20

- 30 <210> 156  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 156

Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Asn Gln Arg  
 20

<210> 157

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<400> 157

Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Arg  
 20

<210> 158

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (1)..(1)

20 <223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2, 4, 14)..(19)

<223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o polar neutro.

25 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (3, 6)..(17)

<223> xaa es un residuo de aminoácido ácido.

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (8)..(8)

30 <223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro.

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (9)..(9)

35 <223> xaa es E, D, o Q.

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (18)..(18)

40 <223> xaa es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro, polar neutro o básico.

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (20)..(20)

<223> xaa está ausente o es un residuo de aminoácido.

45 <400> 158

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly xaa xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa xaa  
 20

5 <210> 159  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2  
 <400> 159  
 ccgatccgtc aggaagaatg cgactggac ccgtggacct gcgaacacat gtggaaagt 60  
 10 <210> 160  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2  
 <400> 160  
 accaacatcc aggaagaatg cgaatggac ccgtggacct gcgaccacat gccggtaaa 60  
 20 <210> 161  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2  
 <400> 161  
 25 tggtacgaac aggacgcttg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat ggctgaagt 60  
 <210> 162  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2  
 <400> 162  
 aaccgtctgc aggaagttt cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat gaaaaacgtt 60  
 35 <210> 163  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2  
 40 <400> 163  
 gctgctaccc aggaagaatg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgtcc 60  
 <210> 164  
 <211> 60

	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2		
5	<400>	164		
	ctgcgtcacc	aggaagggtt	cgaatggac	ccgtggacct
			gcgaacacat	gttcgactgg
				60
	<210>	165		
	<211>	60		
	<212>	ADN		
10	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2		
	<400>	165		
	gttccgcgtc	agaaaagactg	cgaatggac	ccgtggacct
			gcgaacacat	gtacgttgg
				60
15	<210>	166		
	<211>	60		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
20	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2		
	<400>	166		
	tgggctgctc	aggaagaatg	cgaatggat	ccgtggactt
			gcgaacacat	gggtcgtatg
				60
	<210>	167		
	<211>	60		
25	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2		
	<400>	167		
30	acttggccgc	aggacaaaatg	cgaatggat	ccgtggactt
			gcgaacacat	gggttctact
				60
	<210>	168		
	<211>	60		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
35	<220>			
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2		
	<400>	168		
	ggtcactccc	aggaagaatg	cgggtggac	ccgtggacct
			gcgaacacat	gggtacgtcc
				60
40	<210>	169		
	<211>	60		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2		
45	<400>	169		
	cagcactggc	aggaagaatg	cgaatggac	ccgtggacct
			gcgaccacat	gccgtccaaa
				60

	<210>	170	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
5	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	170	
	aacgttcgtc agaaaaatg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat gccggtcgt		
			60
10	<210>	171	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
15	<400>	171	
	aaatccggtc aggttgaatg caactggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgtaac		
			60
	<210>	172	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
20	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	172	
	gttaaaaccc aggaacactg cgactggac ccgtggacct gcgaacacat gcgtgaatgg		
			60
25	<210>	173	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
30	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	173	
	gctgggtc aggaagggtg cgactggac ccgtggacct gcgaacacat gctgccatg		
			60
	<210>	174	
	<211>	60	
35	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	174	
40	ccgttaacc aggaagactg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat gccgccatg		
			60
	<210>	175	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
45	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	175	

	cgtgctccgc aggaagactg cgaatggac ccgtggacct gcgctcacat ggacatcaa	60
	<210> 176	
	<211> 60	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 176	
	cacggtcaga acatggaatg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat gttccgttac	60
10	<210> 177	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 177	
	ccgcgtctgc aggaagaatg cgttggac ccgtggacct gcgaacacat gccgctcg	60
	<210> 178	
	<211> 60	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 178	
25	cgtaccaccc agaaaaatg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat ggaatcccag	60
	<210> 179	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 179	
	cagacccccc aggaagactg cgttggac ccgtggacct gcgaccacat ggttcc	60
	<210> 180	
	<211> 60	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
40	<400> 180	
	caggttatcg gtcgtccgtg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacct ggaagg	60
	<210> 181	
	<211> 60	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	

	<400> 181	
	tggctcagc aggaagaatg cgctggac ccgtggacct gcgaccacat ggttggctg	60
5	<210> 182	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 182	
10	ctgccccgtc aggaagactg cgaatggac ccgtggacct gcgaacacat ggttcggtcc	60
	<210> 183	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 183	
	ccgatgaacc aggttaatg cgactggac ccgtggacct gcgaacacat gcccgttcc	60
20	<210> 184	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
25	<400> 184	
	ttcggttgt ctacggttc cgaatggat ccgtggactt gcgaacacat gggttctacc	60
	<210> 185	
	<211> 60	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 185	
	aaatccaccc aggacgactg cgactggac ccgtggacct gcgaacacat ggttggtccg	60
35	<210> 186	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 186	
	ggccgcgtt tctccacccg ccagtggac ccgtggacct gcgaacacat ggaccagctg	60
45	<210> 187	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 187	
	tccaccatcg gtgacatgtg cgaatggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggtgac	60
5	<210> 188	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
10	<400> 188	
	gttctgggtg gtcagggttg cgaatggac ccgtggacct gccgtctgct gcagggttgg	60
	<210> 189	
	<211> 60	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 189	
	gttctgggtg gtcagggttg ccagtggac ccgtggacct gctcccacat ggaagacggt	60
20	<210> 190	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 190	
	accaccatcg gttccatgtg cgaatggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggtggt	60
	<210> 191	
	<211> 60	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 191	
35	accaaaggt aatccgttg ccagtggac ccgtggacct gctcccacat gcagtccggt	60
	<210> 192	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 192	
	accaccatcg gttccatgtg ccagtggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggtggt	60
	<210> 193	
45	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	193	
		tggtaacg aagttttg cgaatggac ccgtggacct gcaaccactg ggacaccccg	60
5	<210>	194	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
10	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	194	
		gttgcagg ttgtatgtg ccagtggac ccgtggacct gcaaacacat gctgtcag	60
	<210>	195	
	<211>	60	
15	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	195	
20		gctttgggtt cccagacctg cgaatggac ccgtggacct gcttcacat gttgaagt	60
	<210>	196	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
25	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	196	
		caggatgtt aatgttctg cgaatggac ccgtggacct gcttcacat cttttaccgt	60
	<210>	197	
30	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
35	<400>	197	
		accaccatcg gttccatgtg ccagtggac ccgtggacct gcttcacat cttttaccgt	60
	<210>	198	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
40	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	198	
		acctccacgc gtgtgggtt cgaatggac ccgtggacct gcttcacat cttttaccgt	60
45	<210>	199	
	<211>	60	
	<212>	ADN	

	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	199	
5	cagtggcctt ggccgcgtg cgaatggac ccgtggacct gccagaccgt ttggccgtcc		60
	<210>	200	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
10	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	200	
	ggtacctccc cgtcctctg ccagtggac ccgtggacct gctcccacat gggtcagggt		60
15	<210>	201	
	<211>	42	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
20	<400>	201	
	caggaagaat gcgaatggaa cccatggact tgcgaacaca tg		42
	<210>	202	
	<211>	66	
	<212>	ADN	
25	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	202	
	cagaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactt catcttccac		60
	tacacc		66
30	<210>	203	
	<211>	66	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
35	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	203	
	ctgaacttca ccccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag		60
	cagtcc		66
	<210>	204	
	<211>	66	
40	<212>	ADN,	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	204	

	<b>acccaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag</b>	<b>60</b>
	<b>caccag</b>	<b>66</b>
	<210> 205	
	<211> 66	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 205	
	<b>gttaaattca aaccgctgga cgctctggaa cagaccctgt acgaacactg gatgttccag</b>	<b>60</b>
	<b>caggct</b>	<b>66</b>
10	<210> 206	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 206	
	<b>gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagca gaccttccag</b>	<b>60</b>
	<b>gaacgt</b>	<b>66</b>
	<210> 207	
	<211> 66	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 207	
	<b>accaacttca tgccgatgga cgaccctggaa cagcgtctgt acgaacagtt catcctgcag</b>	<b>60</b>
25	<b>cagggt</b>	<b>66</b>
	<210> 208	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 208	
	<b>tccaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag</b>	<b>60</b>
	<b>cacgct</b>	<b>66</b>
	<210> 209	
	<211> 66	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
40	<400> 209	

	<b>cagaaattcc agccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag</b>	<b>60</b>
	<b>caggct</b>	<b>66</b>
	<210> 210	
	<211> 66	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 210	
	<b>cagaacttca aaccgatgga cgaattggaa gacaccctgt acaaacagtt cctgttccag</b>	<b>60</b>
	<b>cactcc</b>	<b>66</b>
10	<210> 211	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 211	
	<b>tacaaattca ccccgctgga cgacctggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag</b>	<b>60</b>
	<b>cacgtt</b>	<b>66</b>
	<210> 212	
	<211> 65	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 212	
	<b>aggaatacga accgctggac gaactggacg aaaccctgtt caaccagtgg atgttccacc</b>	<b>60</b>
25	<b>agcgt</b>	<b>65</b>
	<210> 213	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 213	
	<b>tccaaattca tgccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag</b>	<b>60</b>
	<b>caccag</b>	<b>66</b>
	<210> 214	
35	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
40	<400> 214	

	<b>cagaaatacc agccgctgga cgaactggac aaaaccctgt acgatcagtt catgctgcag</b>	<b>60</b>
	<b>cagggt</b>	<b>66</b>
	<210> 215	
	<211> 66	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 215	
	<b>cagaaattcc agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt acaaacagtg gaccctgcag</b>	<b>60</b>
	<b>cagcgt</b>	<b>66</b>
10	<210> 216	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 216	
	<b>gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaatggctgt accaccagtt caccctgcac</b>	<b>60</b>
	<b>caccag</b>	<b>66</b>
	<210> 217	
	<211> 67	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 217	
	<b>cagaaattca tgccgctgga cgaactggac gaaatccctgt acgaacagt tcatgttccag</b>	<b>60</b>
25	<b>cagtcccc</b>	<b>67</b>
	<210> 218	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 218	
	<b>cagaccttcc agccgctgga cgacctggaa gaatacttgt acgaacagt gatccgtcgt</b>	<b>60</b>
	<b>taccac</b>	<b>66</b>
	<210> 219	
	<211> 66	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
40	<400> 219	

	gaagactaca tgccgctgga cgctctggac gctcagctgt acgaacagtt catcctgctg	60
	<b>cacggt</b>	<b>66</b>
	<210> 220	
	<211> 66	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 220	
	<b>cacaccttcc agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt actaccagt gctgtacgac</b>	60
	<b>cagctg</b>	<b>66</b>
10	<210> 221	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 221	
	<b>tacaaattca aaccgatgga cgaactggaa cagaccctgt acgaagaatt cctgttccag</b>	60
	<b>cacgct</b>	<b>66</b>
	<210> 222	
	<211> 66	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 222	
	<b>accaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactg gatcctgcag</b>	60
25	<b>cactcc</b>	<b>66</b>
	<210> 223	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 223	
	<b>cagaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagt gaccctgcag</b>	60
	<b>cagcgt</b>	<b>66</b>
	<210> 224	
35	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
40	<400> 224	

	<b>accaaattcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag</b>	<b>60</b>
	<b>cagcgt</b>	<b>66</b>
	<210> 225	
	<211> 66	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 225	
	<b>accaacttcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag</b>	<b>60</b>
	<b>cagcgt</b>	<b>66</b>
10	<210> 226	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 226	
	aaattcaacc cgctggacga gctggaagag actctgtacg aacagttac ttttcaacag	60
	<210> 227	
	<211> 60	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 227	
25	gctgggtgta tgcgtccgta cgacggtatg ctgggtggc cgaactacga cgttcaggct	60
	<210> 228	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400> 228	
	cagacttggg acgatccgtg catgcacatt ctgggtccgg ttacttggcg tcgttgcattc	60
	<210> 229	
	<211> 60	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
40	<400> 229	
	gctccgggtc agcgtccgta cgacggtatg ctgggtggc cgacacctacca gcgtatcggt	60
	<210> 230	
	<211> 60	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	230	
		tccggtcagc tgccgtccgtg cgaagaaatc ttccggtgcg gtacccagaa cctggctctg	60
5	<210>	231	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
10	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	231	
		ttcggtgaca aacgtccgct ggaatgcatttccggtggtc cgatccagct gtgccccgcgt	60
	<210>	232	
	<211>	60	
15	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	232	
20	ggtcaggacc tgccgtccgtg cgaagacatg ttccggtgcg gtacccaaaga ctggtaacggt	60	
	<210>	233	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
25	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	233	
		ggtttcgaat actgcgacgg tatggaagac ccgttcacct tcgggtgcga caaacagacc	60
30	<210>	234	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
35	<400>	234	
		aaactggaat actgcgacgg tatggaagac ccgttcaccc agggttgcga caaccagtcc	60
	<210>	235	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
40	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	235	
		ctgcaggaat ggtgcgaagg tggtaagac ccgttcacct tcgggtgcga aaaacagcgt	60
45	<210>	236	
	<211>	60	
	<212>	ADN	

	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	236	
5	gctcaggact actgcgaagg tatggaagac ccgttcacct tcggttgcga aatgcagaaa		60
	<210>	237	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
10	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	237	
	ctgctggact actgcgaagg tggcaggac ccgttcacct tcggttgcga aaacctggac		60
15	<210>	238	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
20	<400>	238	
	caccaggaat actgcgaagg tatggaagac ccgttcacct tcggttgcga ataccagggt		60
	<210>	239	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
25	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	239	
	atgctggact actgcgaagg tatggacgac ccgttcacct tcggttgcga caaacagatg		60
30	<210>	240	
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
35	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	240	
	ctgcaggact actgcgaagg tggcaggac ccgttcacct tcggttgcga aaaccagcgt		60
	<210>	241	
	<211>	60	
40	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2	
	<400>	241	
45	ctgcaggact actgcgaagg tggcaggac ccgttcacct tcggttgcga aaaacagcgt		60
	<210>	242	

<211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2  
 <400> 242  
 ttgcactact gcgaaagggtgt tgaagacccg ttcaacttcg gctgtgataa ccac 54  
 <210> 243  
 <211> 250  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido que codifica ADN capaz de unirse a Ang-2  
 <400> 243  
 Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 20 25 30  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 35 40 45  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 50 55 60  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 65 70 75 80  
 15 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

	85	90	95
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
	100 105 110		
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
	115 120 125		
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
	130 135 140		
	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
	145 150 155 160		
	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
	165 170 175		
	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
	180 185 190		
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
	195 200 205		
	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
	210 215 220		
	Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp		
	225 230 235 240		
	Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn		
	245 250		

&lt;210&gt; 244

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; ADN

5 &lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleótido

&lt;400&gt; 244 29

caaacgaatg gatcctcatt aaagccaga

29

10 &lt;210&gt; 245

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

15 &lt;223&gt; Oligonucleótido

&lt;400&gt; 245

ggtggtgccgg ccgcactcga gactgtgaa agttgttag ca

42

&lt;210&gt; 246

&lt;211&gt; 29

20 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

<223>	Oligonucleótido	
<400>	246	
	caaacgaatg gatcctcatt aaagccaga	29
5	<210> 247	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
10	<400> 247	
	aacacaaaag tgcacagggt ggaggtggtg gtgcggccgc act	43
15	<210> 248	
	<211> 91	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 248	
	cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn	
	1	5
	10 15	
	Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Asn	
	20	25
	30	
	Lys Asn Asn Lys Ser Ala Arg Thr Gly Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly	
	35	40
	45	
	Thr Gly Gly Ala Ser Cys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn	
	50	55
	60	
	Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys	
	65	70
	75 80	
20	Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala	
	85	90
	<210> 249	
	<211> 91	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 249	

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn  
 1 5 10 15

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Ala Ala Lys Cys Gly Lys Cys Cys  
 20 25 30

Lys Asn Asn Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Ala Thr Lys Thr Thr Lys  
 35 40 45

Gly Gly Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Ala Cys Lys Thr Ala Lys Cys  
 50 55 60

Ala Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys  
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala  
 85 90

<210> 250

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 250

cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn  
 1 5 10 15

Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr  
 20 25 30

Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys  
 35 40 45

Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr  
 50 55 60

Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn  
 65 70 75 80

Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr  
 85 90 95

10 <210> 251

<211> 91

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido

<400> 251

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn  
 1 5 10 15

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Lys Gly Ala Lys Gly Ala  
 20 25 30

Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Thr Gly Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys  
 35 40 45

Thr Gly Lys Ala Cys Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Ala  
 50 55 60

Thr Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys  
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala  
 85 90

<210> 252

<211> 89

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos

<400> 252

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn  
 1 5 10 15

Asn Lys Thr Thr Lys Gly Ala Lys Thr Ala Lys Asn Asn Lys Gly Ala  
 20 25 30

Lys Gly Gly Lys Gly Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys  
 35 40 45

Thr Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Gly  
 50 55 60

Ala Lys Ala Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys  
 65 70 75 80

10 Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr  
 85

<210> 253

<211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótidos

<400> 253

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn  
 1 5 10 15

Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr  
 20 25 30

Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys  
 35 40 45

Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr  
 50 55 60

Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn  
 65 70 75 80

Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr  
 85 90 95

<210> 254

<211> 15

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 254

10 cacagtgcac agggg 15

<210> 255

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido

<400> 255

tgatctcgag agaattg

16

<210> 256

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

25 <400> 256

gttagctcac tcattaggca c

21

<210> 257

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 257 21

gtaccgtaac actgagttc g

21

<210> 258  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 <400> 258 18  
 ttacacttta tgcttccg 18  
 <210> 259  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2  
 15 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2)..(2)  
 <223> xaa = Fc  
 <400> 259  
 Met xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Ile Arg Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15  
 20 Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Trp Glu Val Leu Glu  
 20 25 30  
 <210> 260  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2)..(2)  
 30 <223> Xaa = Fc  
 <400> 260  
 Met xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15  
 35 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Gly Lys Leu Glu  
 20 25 30  
 <210> 261  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2  
 40 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 261

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Ala Glu Val Leu Glu  
 20 25 . 30

5 <210> 262

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

10 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 262

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Asn Val Leu Glu  
 20 25 . 30

15 <210> 263

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa = Fc

<400> 263

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu  
 20 25 . 30

30 <210> 264

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

35 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 264

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Arg His Gln Glu Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Asp Trp Leu Glu  
 20 25 30

<210> 265

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

<400> 265

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Tyr Val Gly Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 266

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 266

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Ile Ser His Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Val Gly Leu Glu  
 20 25 30

30 <210> 267

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 267

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Arg Met Leu Glu  
 20 25 30

5 <210> 268

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

10 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 268

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 269

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 269

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly His Ser Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Thr Ser Leu Glu  
 20 25 30

30 <210> 270

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

35 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 270

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln His Trp Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Ser Lys Leu Glu  
 20 25 30

<210> 271

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 271

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys  
 1 . 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Val Arg Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 272

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

25 <400> 272

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys  
 1 5 10 15

Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Asn Leu Glu  
 20 25 30

<210> 273

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 273

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Lys Thr Gln Glu His Cys  
 1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Arg Glu Trp Leu Glu  
 20 25 30

5 <210> 274

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

10 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 274

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys  
 1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Pro Met Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 275

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 275

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Pro Met Leu Glu  
 20 25 30

30 <210> 276

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

35 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 276

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Asp Ile Lys Leu Glu  
 20 25 30

<210> 277

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 277

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gly Gln Asn Met Glu Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Arg Tyr Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 278

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 278

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Leu Arg Leu Glu  
 20 25 30

<210> 279

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 279

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Ser Gln Leu Glu  
 20 25 30

5 <210> 280

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

10 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 280

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys  
 1 5 10 15

Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Ser Ser Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 281

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 281

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Leu Glu Gly Leu Leu Glu  
 20 25 30

30 <210> 282

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa= Fc

<400> 282

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Gly Leu Leu Glu  
 20 25 30

<210> 283

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 283

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Arg Ser Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 284

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 284

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Met Asn Gln Val Glu Cys  
 1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu  
 20 25 30

<210> 285

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 285

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu  
 20 25 30

<210> 286

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

10 <221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 286

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys  
 1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Gly Pro Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 287

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 287

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Asp Gln Leu Leu Glu  
 20 25 30

30 <210> 288

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 288

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Val Asp Leu Glu  
 20 25 30

<210> 289

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 289

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu

20

25

30

15 <210> 290

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

25 <400> 290

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Leu Glu Asp Gly Leu Glu

20

25

30

<210> 291

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 291

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu  
 20 25 30

5 <210> 292

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

10 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 292

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Gln Ser Gly Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 293

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 293

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu  
 20 25 30

30 <210> 294

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

35 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 294

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Val Asn Glu Val Val Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His Trp Asp Thr Pro Leu Glu  
 20 25 30

<210> 295

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 295

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Val Gln Val Gly Met Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Met Arg Leu Gln Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 296

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 296

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Leu Val Glu Val Leu Glu  
 20 25 30

<210> 297

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 297

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Gly Met Lys Met Phe Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Ile Val Tyr Arg Leu Glu  
 20 25 30

<210> 298

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

10 <221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

<400> 298

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Gly Gly Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 299

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa= Fc

25 <400> 299

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His Leu Thr Tyr Thr Leu Glu  
 20 25 30

30 <210> 300

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 300

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr Val Trp Pro Ser Leu Glu  
 20 25 30

<210> 301

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 301

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Val Gln Gly Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 302

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 302

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Gly Leu His Gln Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys Val Leu Trp Pro Ser Leu Glu  
 20 25 30

<210> 303

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 303

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Trp Arg Ser Gln Val Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn Leu Gly Gly Asp Trp Leu Glu  
 20 25 30

<210> 304

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

10 <221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 304

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Phe Phe Tyr Gly Ala Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 305

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 305

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Thr Phe Ala Arg Gln Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala Leu Gly Gly Asn Trp Leu Glu  
 20 25 30

30 <210> 306

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 306

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Pro Leu Pro Leu Met Leu Glu  
 20 25 30

<210> 307

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 307

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Pro Glu Asp Met Cys Ser  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Trp His Leu Gln Gly Tyr Cys Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 308

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 308

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Trp Gln Leu Ala Val Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Gln Thr Cys Asp His Met Gly Ala Leu Leu Glu  
 20 25 30

<210> 309

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 309

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Leu Val Ser Leu Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Asp Gly Trp Leu Glu  
 20 25 30

5 <210> 310

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

15 <400> 310

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Gly Gly Ala Gly Arg Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu  
 20 25 30

20 <210> 311

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

30 <400> 311

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Phe Leu Pro Asn Glu Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser Asn Leu Pro Glu Ala Leu Glu  
 20 25 30

35 <210> 312

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

40 <400> 312

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu  
 20 25 30

<210> 313

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 313

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Pro Gln Thr Glu Gly Cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu His Gly Trp Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 314

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 314

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Asp Thr Arg Gln Gly cys  
 1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Tyr Gly Met Trp Leu Glu  
 20 25 30

<210> 315

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 315

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu  
 20 25 30

5 <210> 316

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

10 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 316

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 317

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 317

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys  
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu  
 20 25 30

30 <210> 318

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

35 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 318

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

**Gly Xaa**

<210> 319

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 319

Met Gly Ala Gln Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Trp Ile Leu Gln His Ser Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

**Gly Xaa**

15 <210> 320

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial -

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (34)..(34)

<223> xaa = Fc

25 <400> 320

Met Gly Ala Gln Gln Lys Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Asp Gln Phe Met Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

**Gly Xaa**

<210> 321

<211> 34

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (34)..(34)

<223> xaa = Fc

<400> 321

Met Gly Ala Gln Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr  
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly  
20 25 30

5 Gly Xaa

<210> 322

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (34)..(34)

15 <223> xaa = Fc

<400> 322

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr  
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly  
20 25 30

Gly Xaa

<210> 323

<211> 34

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (34)..(34)

25 <223> xaa = Fc

<400> 323

Met Gly Ala Gln Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr  
1 5 10 15

Leu Tyr Asn Gln Trp Met Phe His Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly  
20 25 30

Gly Xaa

30 <210> 324

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>  
 5 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>  
 5 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 324

Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Gln Thr Phe Gln Glu Arg Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

### Gly Xaa

10 <210> 325  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

15 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> xaa = Fc

<400> 325

Met Gly Ala Gln Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

20 <210> 326  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 30 <223> xaa = Fc

<400> 326

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

### Gly Xaa

<210> 327

<211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 5 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2  
  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> xaa = Fc  
  
 10 <220>  
 <221> 'característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa = Fc  
  
 <400> 327  
  
 Met Gly Ala Gln Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr  
 1 5 10 15  
  
 Leu Tyr Lys Gln Phe Leu Phe Gln His Ser Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30  
  
 15 Gly Xaa  
 <210> 328  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2  
  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 25 <223> xaa = FC  
  
 <400> 328  
  
 Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp  
 1 5 10 15  
  
 Leu Tyr His Gln Phe Thr Leu His His Gln Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30  
  
 Gly Xaa  
 <210> 329  
 <211> 34  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2  
  
 <220>  
 35 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> xaa = FC  
  
 <400> 329

Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Val Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

**Gly xaa**

<210> 330

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 330

Met Gly Ala Gln Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Phe Ile Phe His Tyr Thr Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

**Gly Xaa**

<210> 331

<211> 34

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (34)..(34)

<223> xaa = Fc

<400> 331

Met Gly Ala Gln Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Trp Met Phe Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

25 **Gly Xaa**

<210> 332

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (34)..(34)  
 <223> Xaa = Fc

<400> 332

Met Gly Ala Gln Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Leu His Gly Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

Gly Xaa

5 <210> 333  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> xaa = Fc

15 <400> 333

Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Phe Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

Gly Xaa

20 <210> 334  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

25 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> xaa = Fc

<400> 334

Met Gly Ala Gln Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln His Gln Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

Gly Xaa

30 <210> 335  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 5 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> xaa = Fc

<400> 335

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Lys Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

**Gly xaa**

10 <210> 336  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

15 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> xaa = Fc

<400> 336

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Met Phe Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

20 **Gly xaa**  
 <210> 337  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 30 <223> Xaa = Fc

<400> 337

Met Gly Ala Gln Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Gln Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

**Gly xaa**

<210> 338  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 10 <223> Xaa = Fc  
 <400> 338

Met Gly Ala Gln His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Tyr Gln Trp Leu Tyr Asp Gln Leu Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

#### Gly Xaa

15 <210> 339  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2  
 <220>  
 20 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34) .. (34)  
 <223> xaa = Fc  
 <400> 339

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

#### Gly Xaa

25 <210> 340  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa = Fc  
 35 <400> 340

Met Gly Ala Gln Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Ile Arg Arg Tyr His Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

**Gly Xaa**

<210> 341

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 341

Met Gly Ala Gln Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly  
 20 25 30

**Gly Xaa**

<210> 342

<211> 31

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 342

25 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys  
 1 5 10 15

Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln Asn Leu Ala Leu Leu Glu  
 20 25 30

<210> 343

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 343

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr  
 1 5 10 15

Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr Asp Val Gln Ala Leu Glu  
 20 25 30

<210> 344

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

10 <221> característica\_miscelánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 344

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys  
 1 5 10 15

Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys Asp Trp Tyr Gly Leu Glu  
 15 20 25 30

<210> 345

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

25 <221> característica\_miscelánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 345

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr  
 1 5 10 15

Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr Gln Arg Ile Val Leu Glu  
 20 25 30

<210> 346

<211> 31

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

35 <221> característica\_miscelánea

<222> (2) .. (2)

<223> xaa = Fc

<400> 346

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys  
 1 5 10 15

Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp Arg Arg Cys Ile Leu Glu  
 20 25 30

<210> 347

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa=Fc

<400> 347

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu  
 1 5 10 15

Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln Leu Cys Pro Arg Leu Glu  
 20 25 30

<210> 348

<211> 25

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 348

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile  
 1 5 10 15

Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln Leu Glu  
 20 25

25

<210> 349

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

35 <223> Xaa = Fc

<400> 349

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly  
 1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu  
 20 25 30

<210> 350

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 350

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly  
 1 5 10 15

Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Met Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 351

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

25 <400> 351

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly  
 1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Tyr Gln Gly Leu Glu  
 20 25 30

<210> 352

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 352

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly  
 1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Gln Arg Leu Glu  
 20 25 30

<210> 353

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2) .. (2)

<223> xaa = Fc

<400> 353

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Leu Asp Leu Glu  
 20 25 30

<210> 354

<211> 31

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

20 <220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 354

25 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly

1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Thr Leu Glu  
 20 25 30

<210> 355

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 355

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly  
 1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Met Gln Lys Leu Glu  
 20 25 30

<210> 356

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

10 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 356

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly  
 1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu  
 20 25 30

15 <210> 357

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (2)..(2)

<223> Xaa= Fc

25 <400> 357

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly  
 1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys Asp Asn Gln Ser Leu Glu  
 20 25 30

<210> 358

<211> 29

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Pepticuerpos capaces de unirse a Ang-2

<220>

<221> característica\_misclánea

35 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Fc

<400> 358

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val

1

5

10

15

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu

20

25

<210> 359

<211> 32

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido capaz de unirse a An-2

<400> 359

Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp

1

5

10

15

Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu

20

25

30

10

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 149 a SEQ ID NO: 157, inclusive, donde dicho polipéptido es capaz de unirse a Ang-2 y sales fisiológicamente aceptables de esta.

Péptido	SEQ ID NO:	Secuencia
12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS
12-9-3	151	LQEWCEGVEDPFTFGCEKQR
12-9-4	152	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK
12-9-5	153	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD
12-9-6	154	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG
12-9-7	155	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM
12-9-C2	156	LQDYCEGVEDPFTFGCENQR
12-9-C1	157	LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR
12-9	5	FDYCEGVEDPFTFGCDNH

5 2. Un polipéptido de fusión que comprende al menos un péptido de conformidad con la reivindicación 1 y una molécula que previene la degradación y/o aumenta la vida media, reduce la toxicidad, reduce la inmugenicidad o aumenta la actividad biológica de dicho péptido, donde dicho polipéptido de fusión es capaz de unirse a Ang-2 y sales fisiológicamente aceptables de esta.

3. Una composición de fórmula:

10  $(X^1)_a-F^1-(X^2)_b$

y multímeros de esta, donde:

$F^1$  es un vehículo;

$X^1$  y  $X^2$  se selecciona cada uno independientemente de

$-(L^1)_c-P^1;$

15  $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2;$

$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3;$  y

$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3-(L^4)_f-P^4;$

donde uno o más de  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$ , y  $P^4$  comprende cada uno independientemente un polipéptido de conformidad con la reivindicación 1;

20  $L^1$ ,  $L^2$  y  $L^3$  son cada uno independientemente enlazadores; y

a, b, c, d, e y f son cada uno independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de a y b es 1; y sales farmacéuticamente aceptables de esta.

4. La composición de la reivindicación 3 de fórmulas:

$X^1-F^1$

25 o

$F^1-X^2$

y sales fisiológicamente aceptable de esta.

5. La composición de la reivindicación 3 de fórmula:

$$F^1-(L^1)_c-P^1$$

y sales fisiológicamente aceptables de esta.

6. La composición de la reivindicación 3 de fórmula:

5  $F^1-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2$

y sales fisiológicamente aceptable de esta.

7. La composición de la reivindicación 3 de fórmula:

$$P^1-(L^1)_c-F^1-(L^2)_d-P^2$$

y sales fisiológicamente aceptable de esta.

10 8. La composición de la reivindicación 3, donde F1 es un dominio Fc o un fragmento de este.

9. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de conformidad con la reivindicación 1.

10. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9.

11. Una célula receptora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 10.

12. La célula receptora de conformidad con la reivindicación 11, en donde la célula es una célula procariota.

15 13. La célula receptora de conformidad con la reivindicación 12, en donde la célula es una célula E. coli.

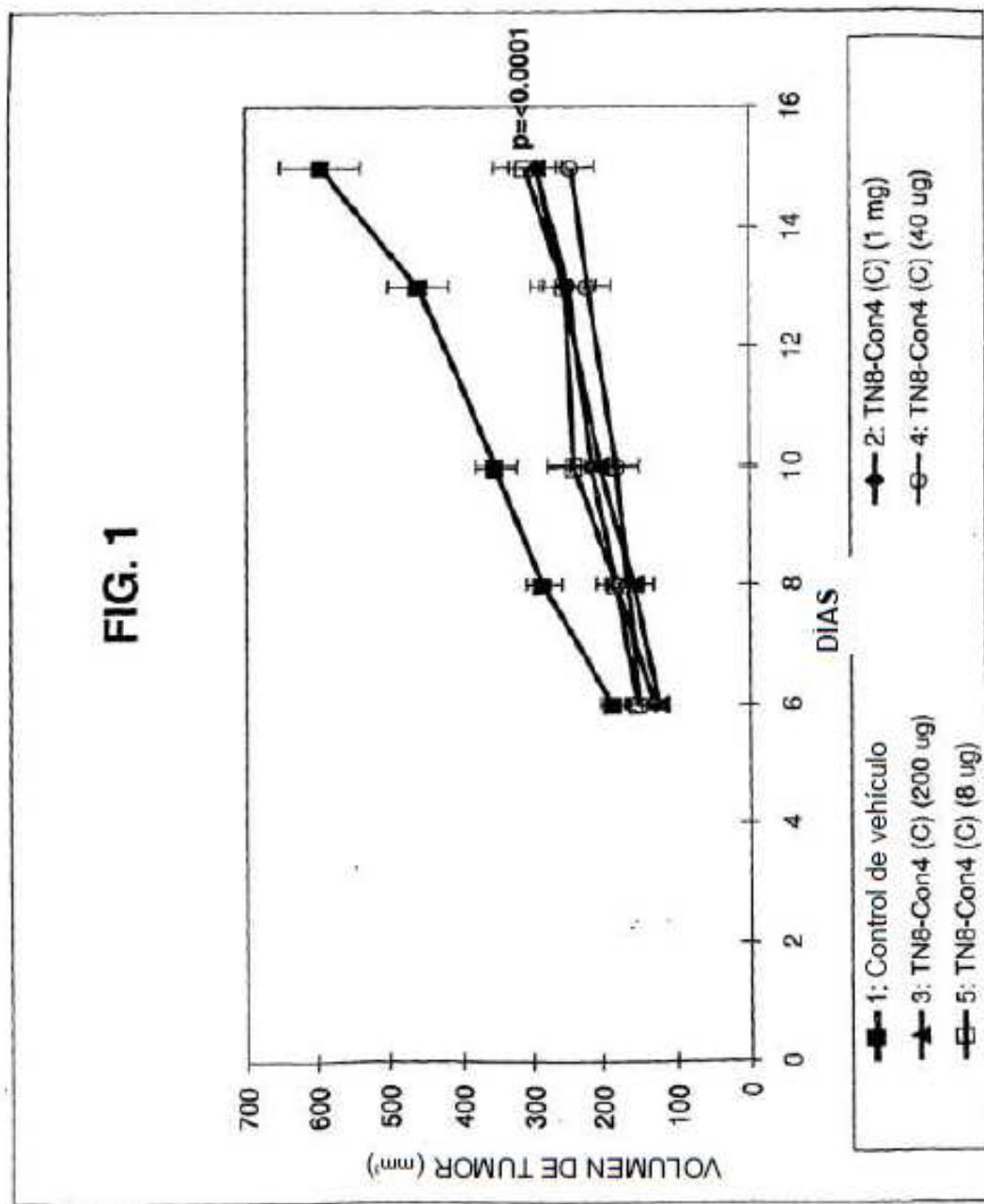
14. La célula receptora de conformidad con la reivindicación 11, en donde la célula es una célula eucariota.

15. Un polipéptido de SEQ ID NO: 5.

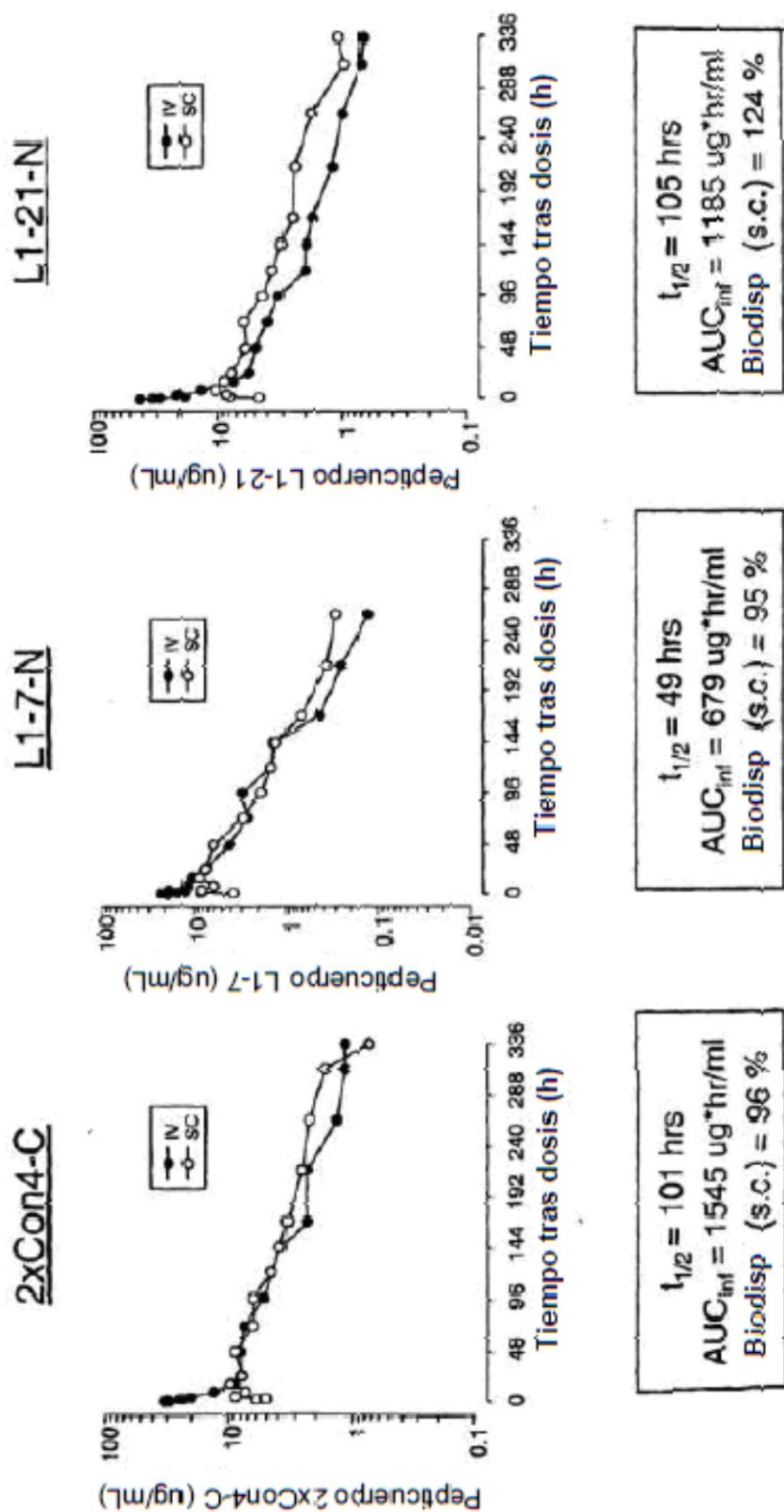
16. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de una composición de conformidad con la reivindicación 1 en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable de este.

20 17. el polipéptido o composición de conformidad con la reivindicación 2 o reivindicación 3 para el uso en la inhibición de la angiogénesis indeseada en un mamífero, el tratamiento de la angiogénesis en un individuo, la modulación de la angiogénesis en un mamífero, la inhibición del crecimiento tumoral caracterizado por la angiogénesis indeseada en un mamífero, el tratamiento del cáncer en un mamífero, la modulación de al menos uno de permeabilidad vascular o infiltración de plasma en un mamífero, el tratamiento de al menos una enfermedad neovascular ocular, obesidad, hemangioblastoma, hemangioma, arterioesclerosis, enfermedad inflamatoria, trastornos inflamatorios, atherosclerosis, endometriosis, enfermedad neoplásica, enfermedad ósea o soriasis en un mamífero.

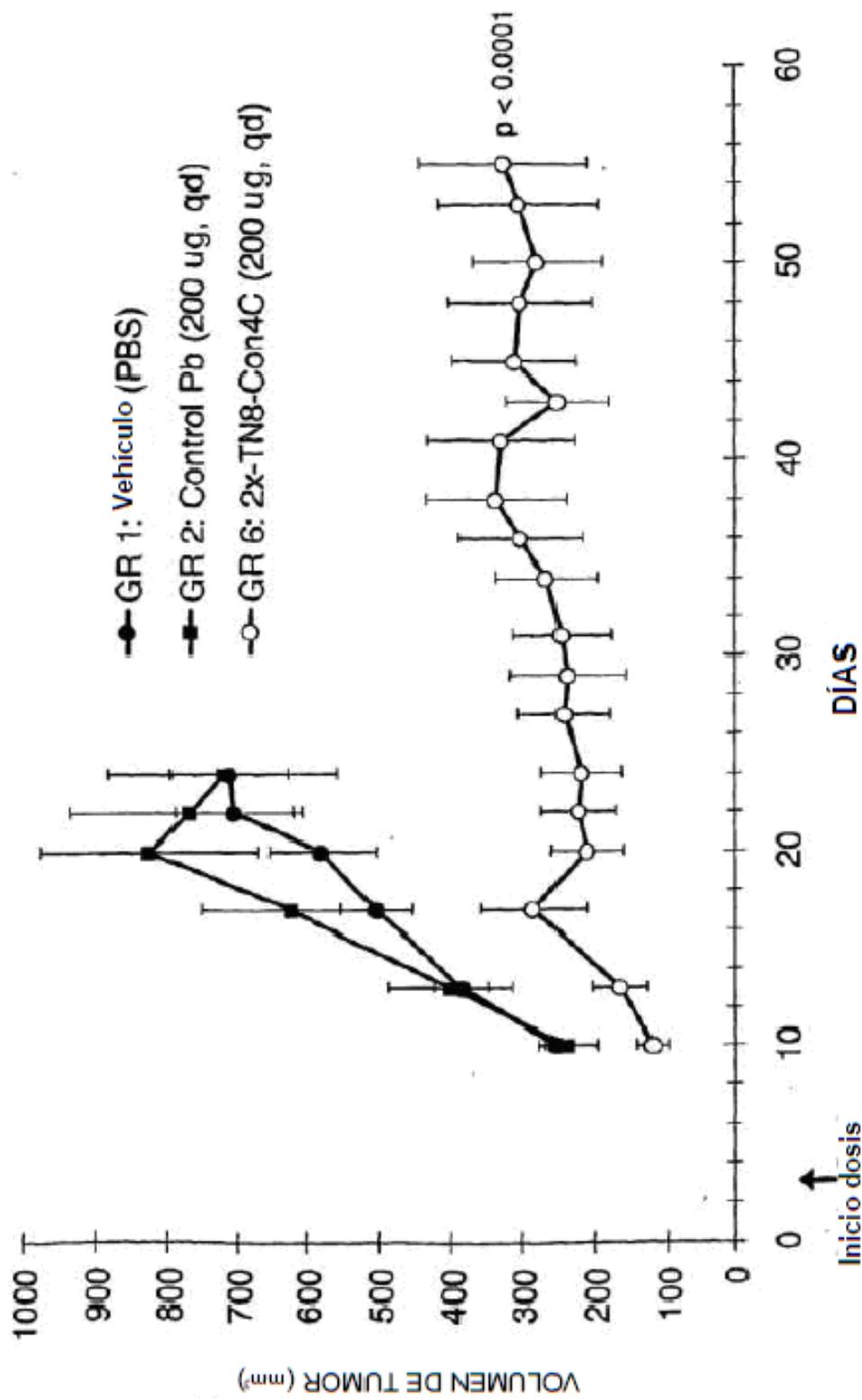
FIG. 1



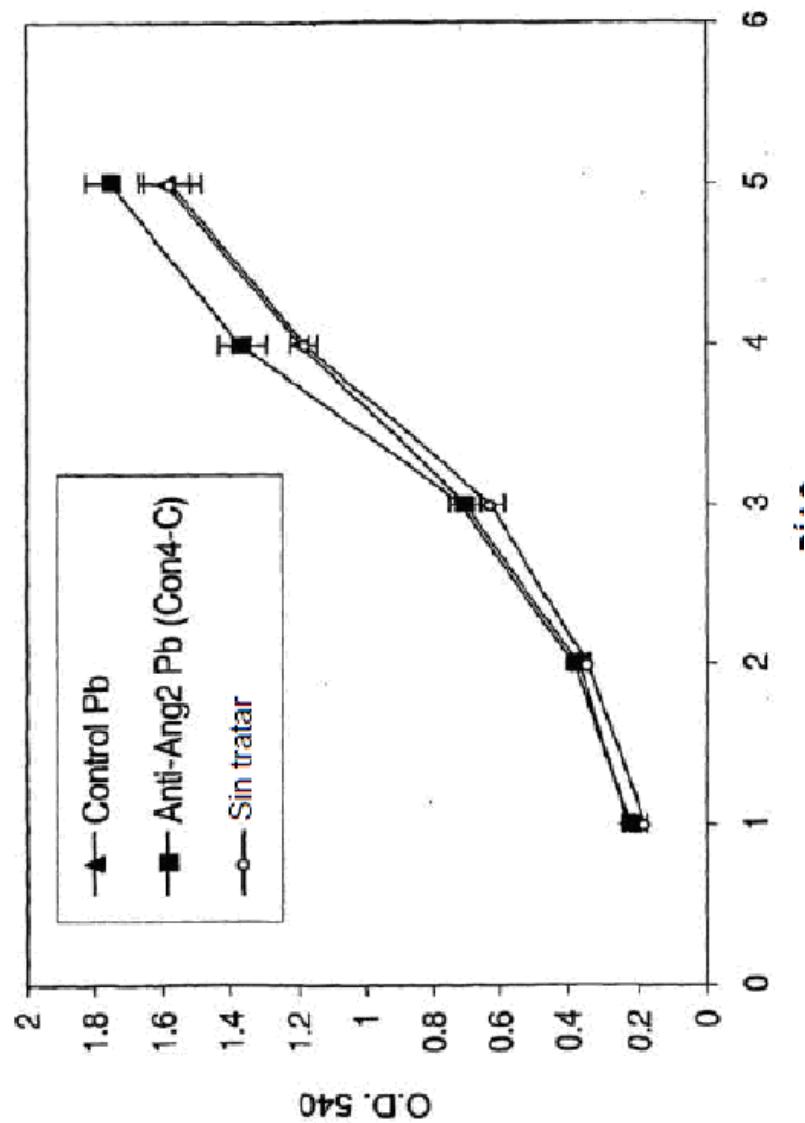
*Figura 2*  
Pepticuerpo PK en ratones (dosis 50 ug)



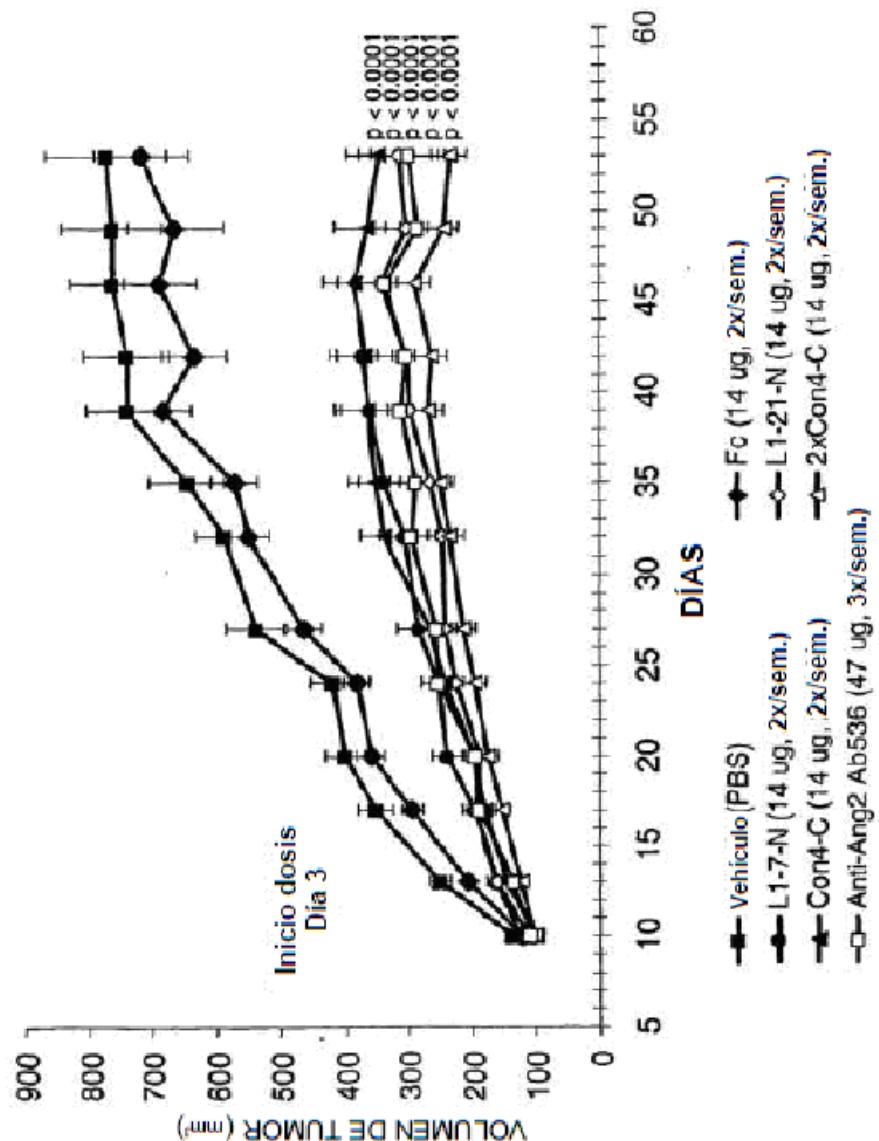
**Figura 3**  
Pepticuerpos Anti-Ang2 inhiben crecimiento de xenoinjerto de tumor A431



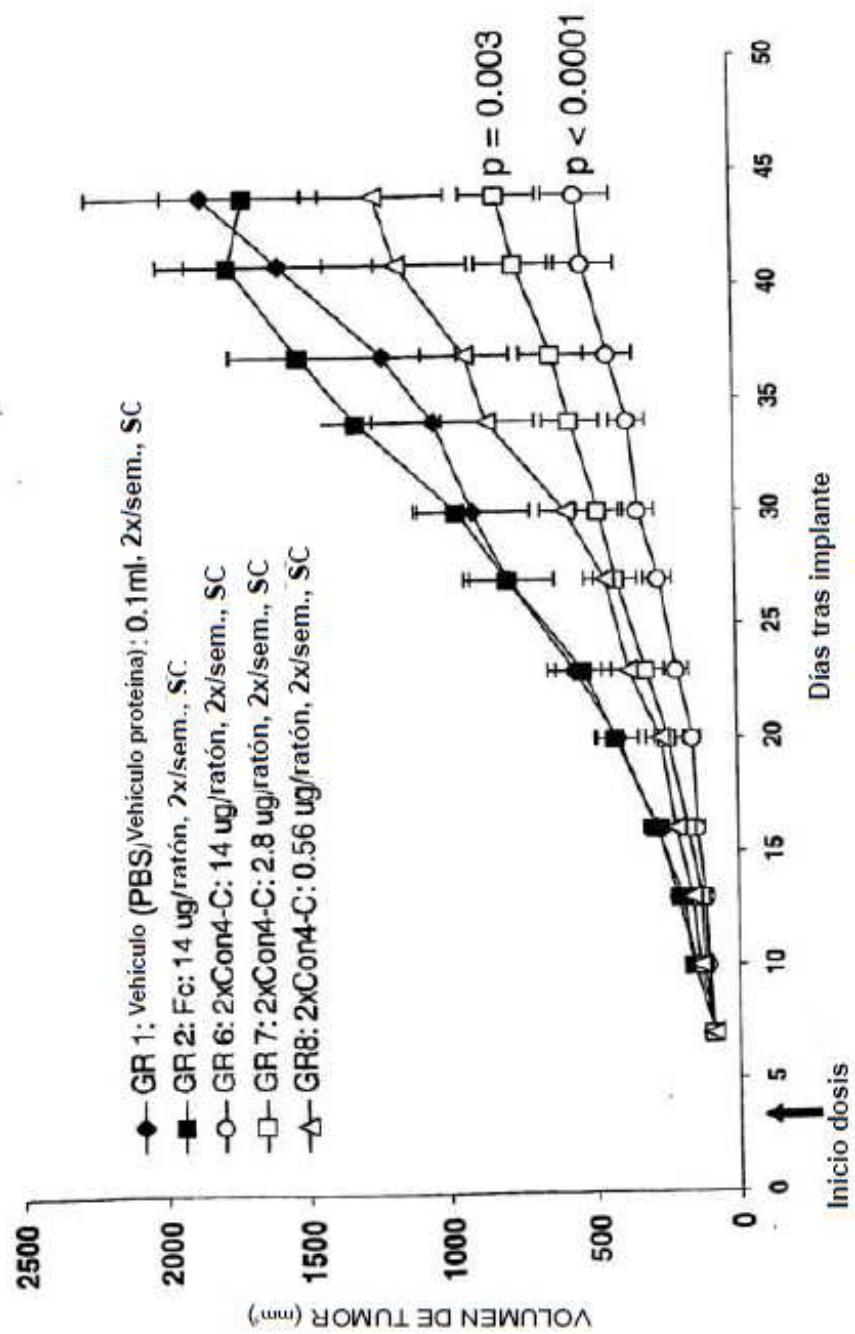
**Figura 4**  
Peptiduero Anti-Ang2 no tiene efecto en el crecimiento de  
células A431 cultivadas



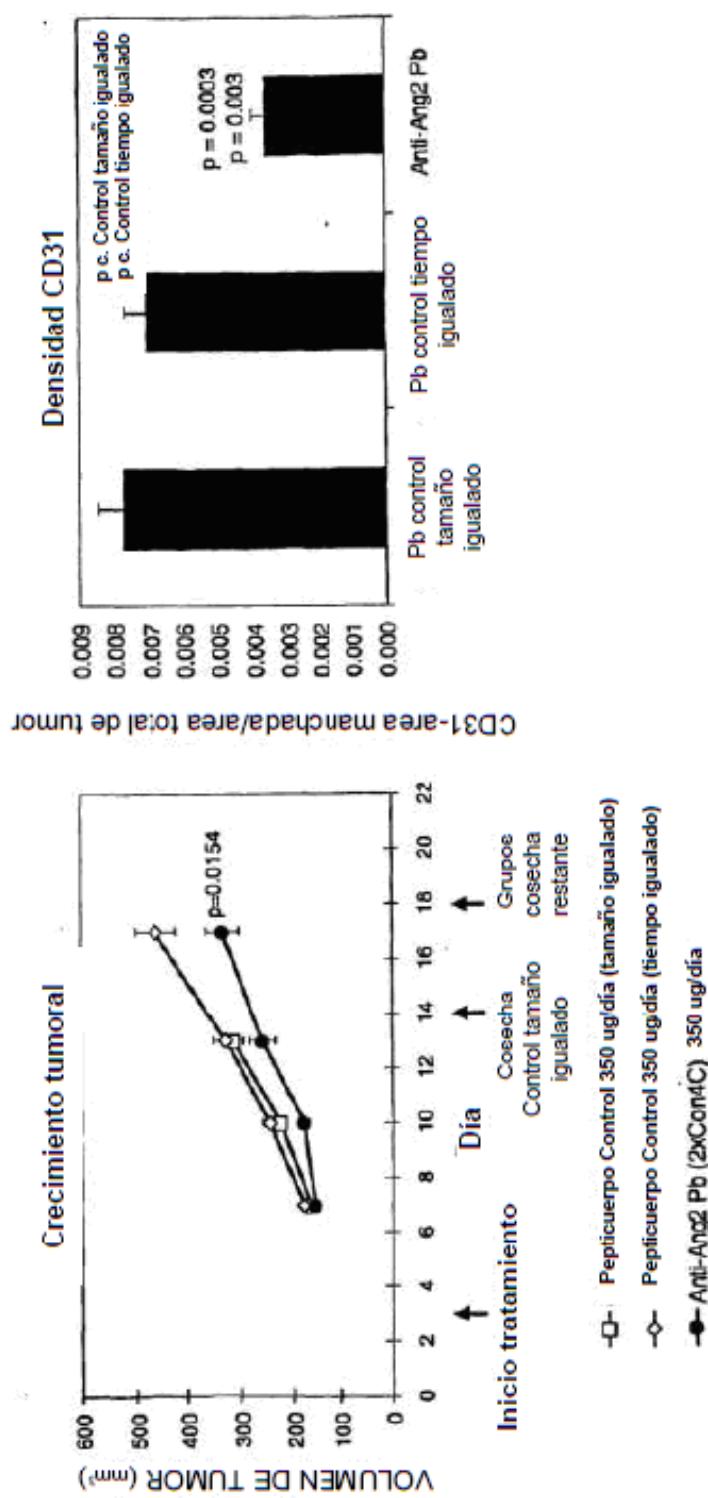
**Figura 5**  
Pepticuerpos Anti-Ang2 inhiben crecimiento de tumor Colo205



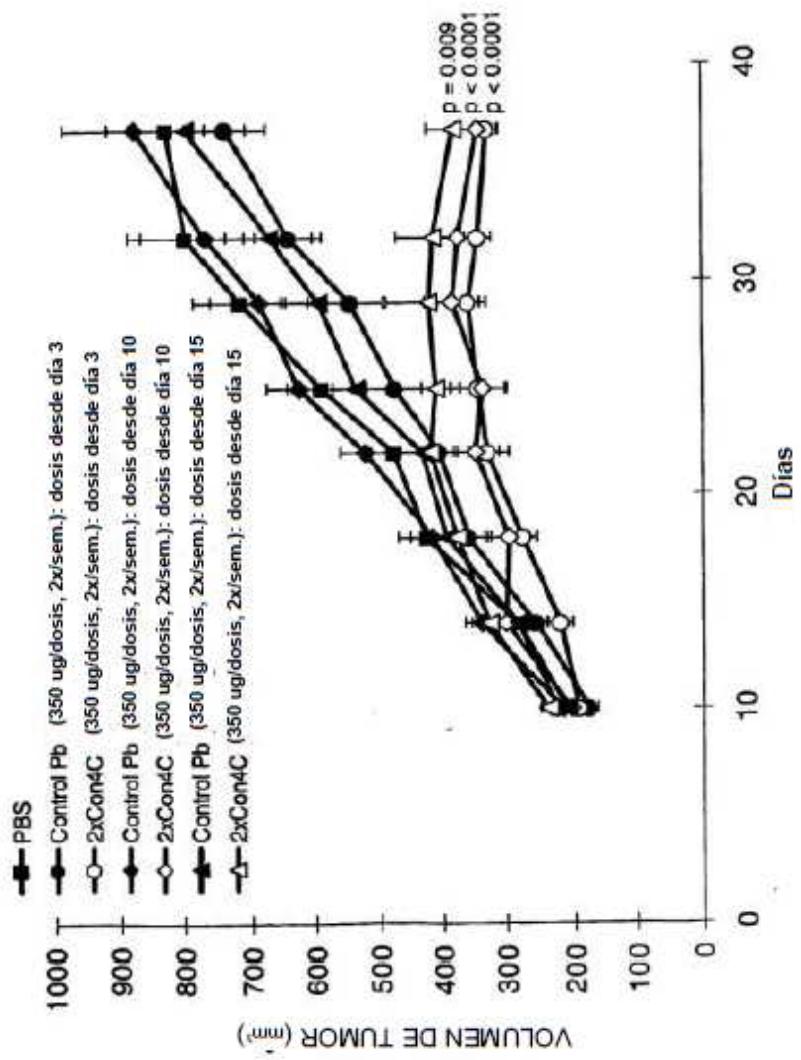
**Efigura 6**  
Pepticuerpos Anti-Ang2 inhiben crecimiento de tumor Colo205



**Figura 7**  
**Terapia de pepticuerpos Anti-Ang2 reduce la densidad de**  
**tinción CD31 de Colo205 en xenoinjertos de tumor**



**Figura 8**  
Pbs Anti-Ang2 inhibe crecimiento tumoral Colo205, sin importar cuándo se inicia la dosis



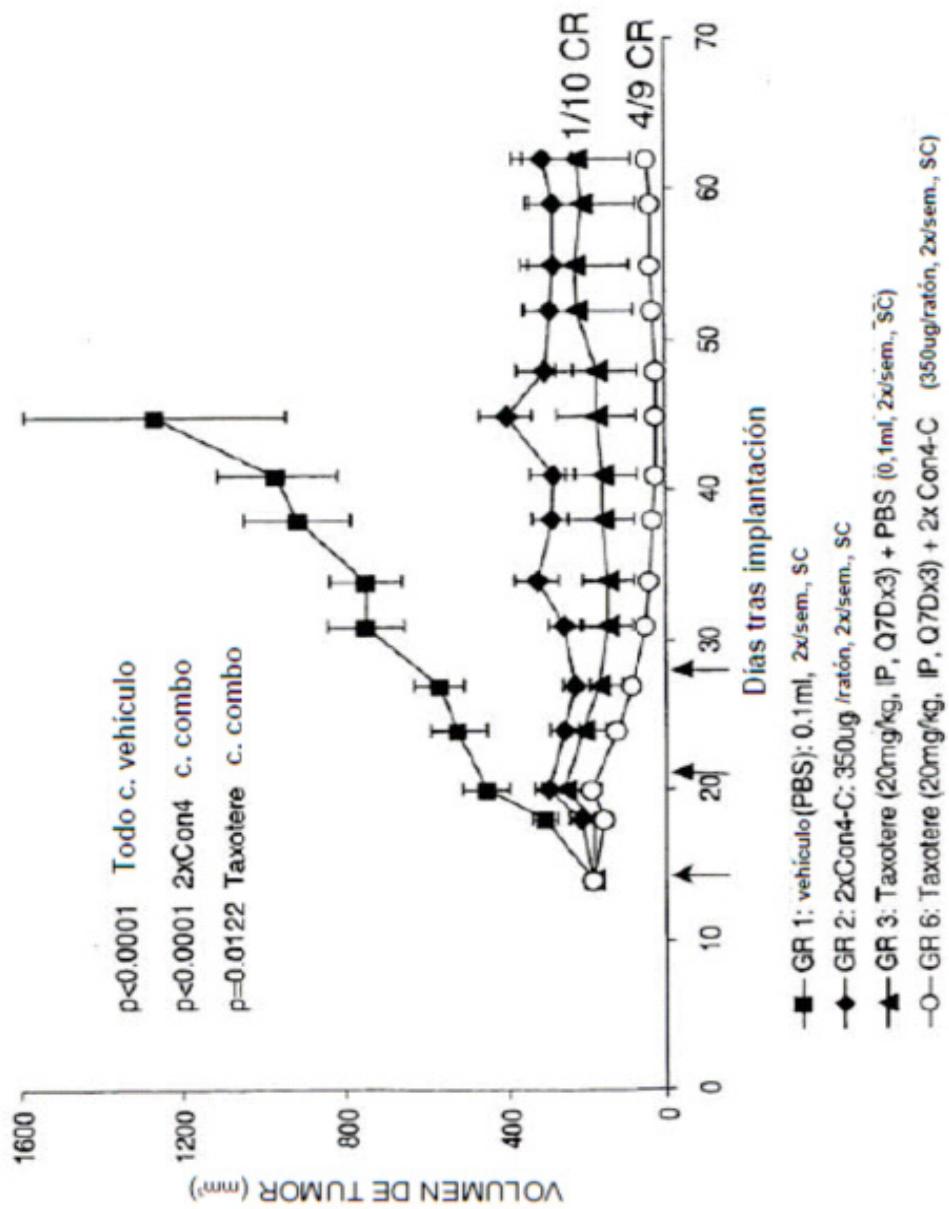
**Figura 9**  
Tasas de respuesta completas en estudios de dosificación a largo plazo

Estudio	Modelo tumor	Terapia	Duración dosificación (semanas)		% CR
			Programa dosificación*	60**	
082801	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/ sem.	10	60
100201	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/ sem.	11	40**
100201	A431	2xCon4-C	200 ug/ día	11	30**
100201	A431	2xCon4-C	40 ug/ día	11	0
100201	A431	2xCon4-C	8 ug/ día	11	20
012902	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/ sem.	12	10
012902	Colo205	2xCon4-C	140 ug/wk	12	0
031802	Colo205	2xCon4-C	350 ug, 2x/ sem.	10	20
111901	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/ sem.	21	20
042602	Colo205	2xCon4-C	14 ug, 2x/ sem.	11	21

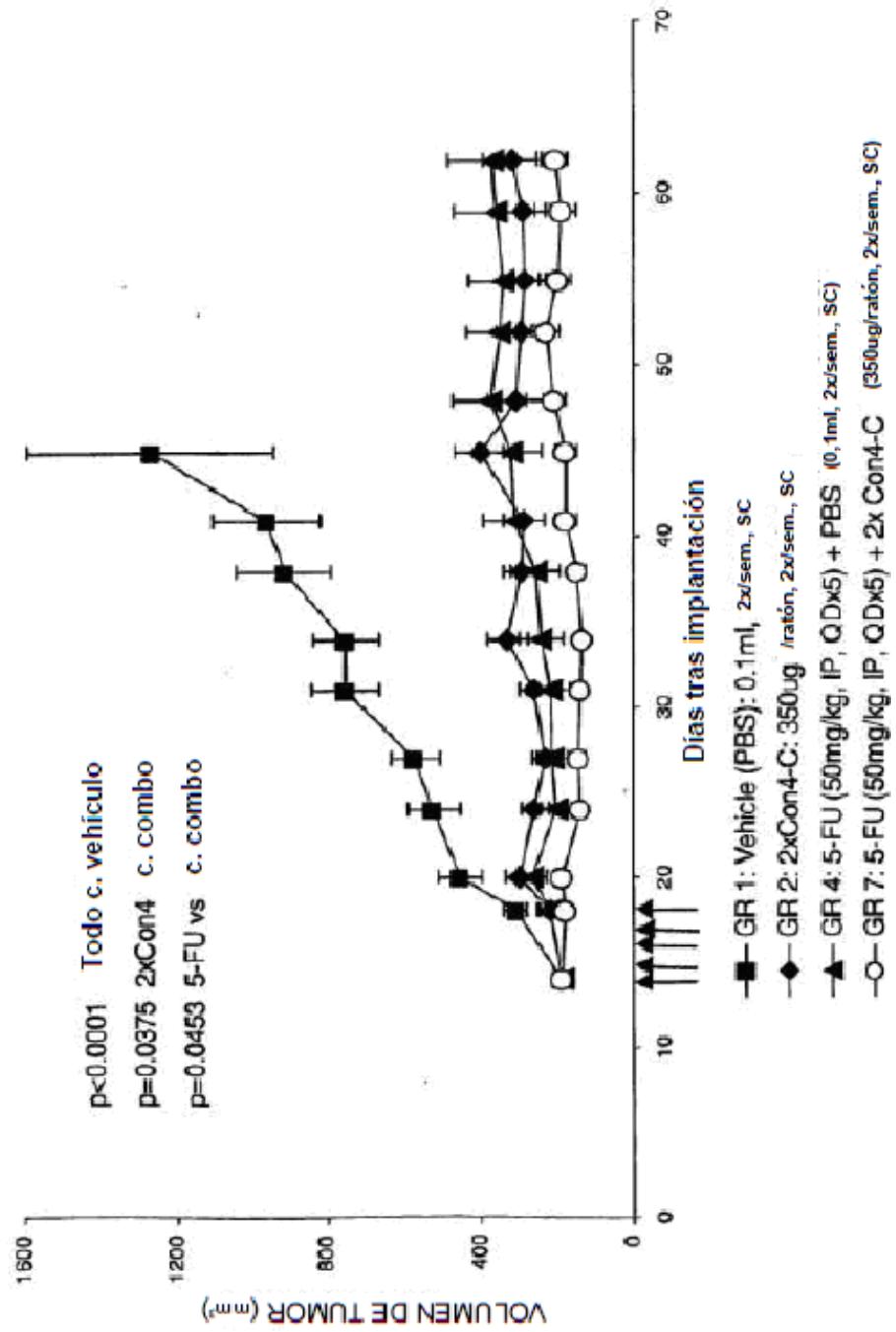
\* En todos los estudios, dosis comienzan el día 3

\*\* El fármaco se retira tras alcanzar CR y no se observa reaparición de tumor. Seguimiento medio 15,3 semanas (intervalo de 6-27 semanas)

*Figura 10a*  
Combinación de Pb con taxotere en el modelo de tumor Colo205

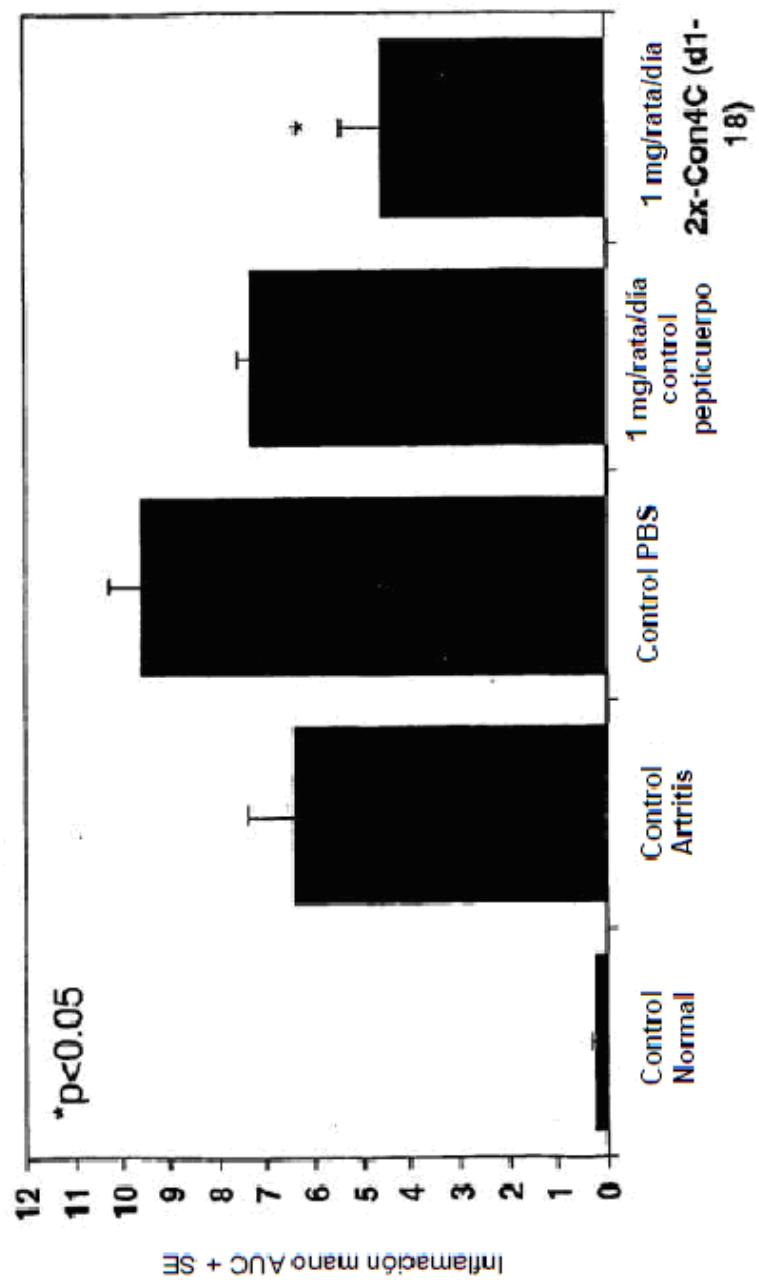


**Figura 10b**  
Combinación de Pb con 5-FU en el modelo de tumor Colo205



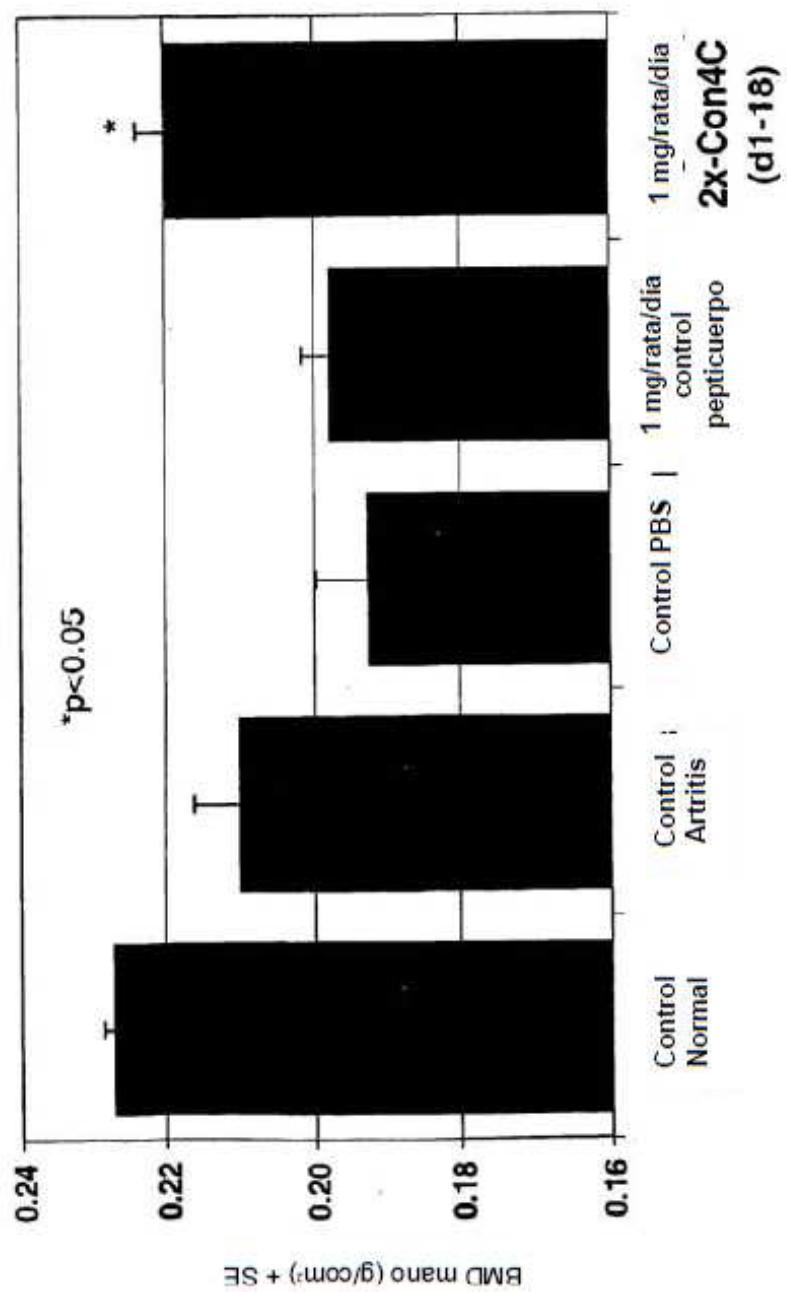
*Figura 11a*

Anticuerpos Anti-Ang2 inhiben inflamación de mano en el modelo de artritis inducido por adyuvante

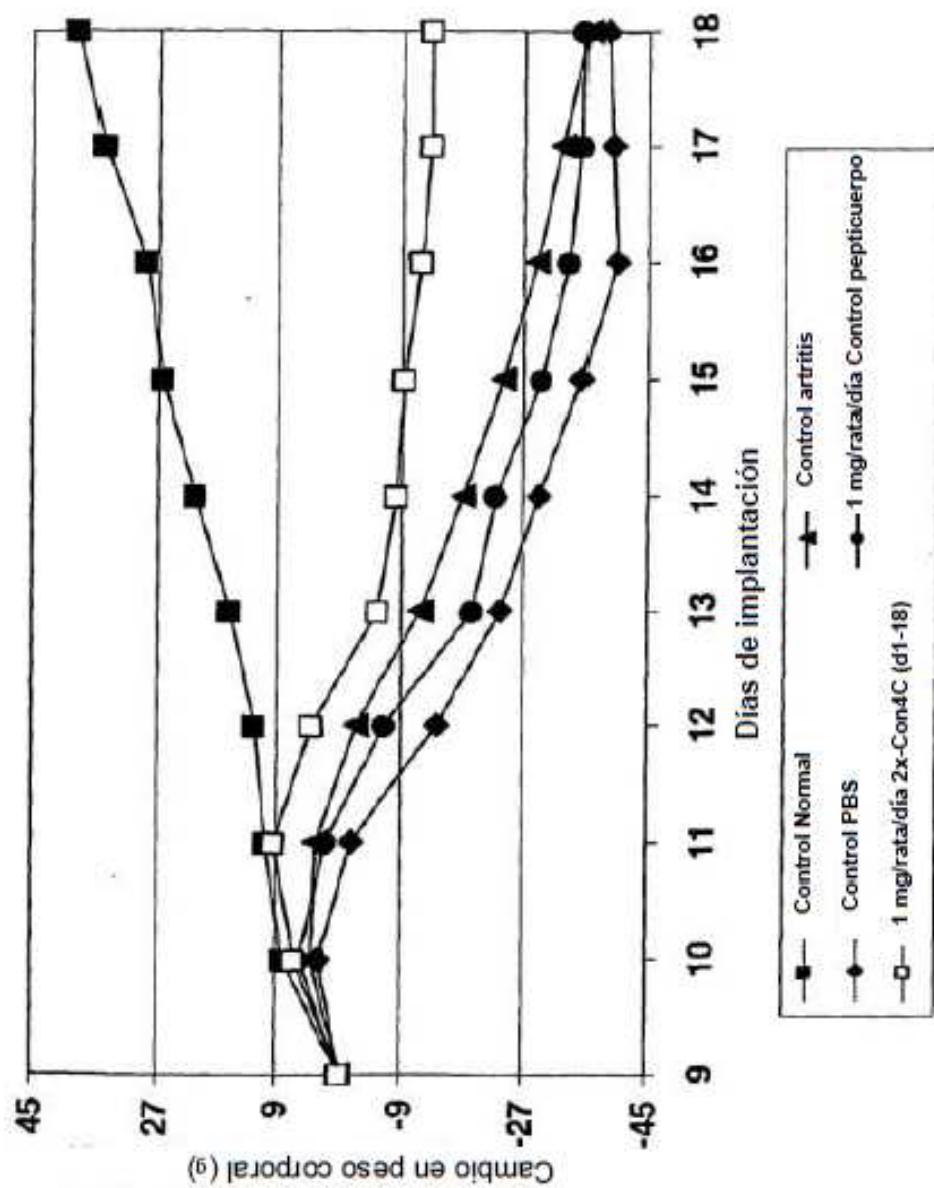


*Figura 11b*

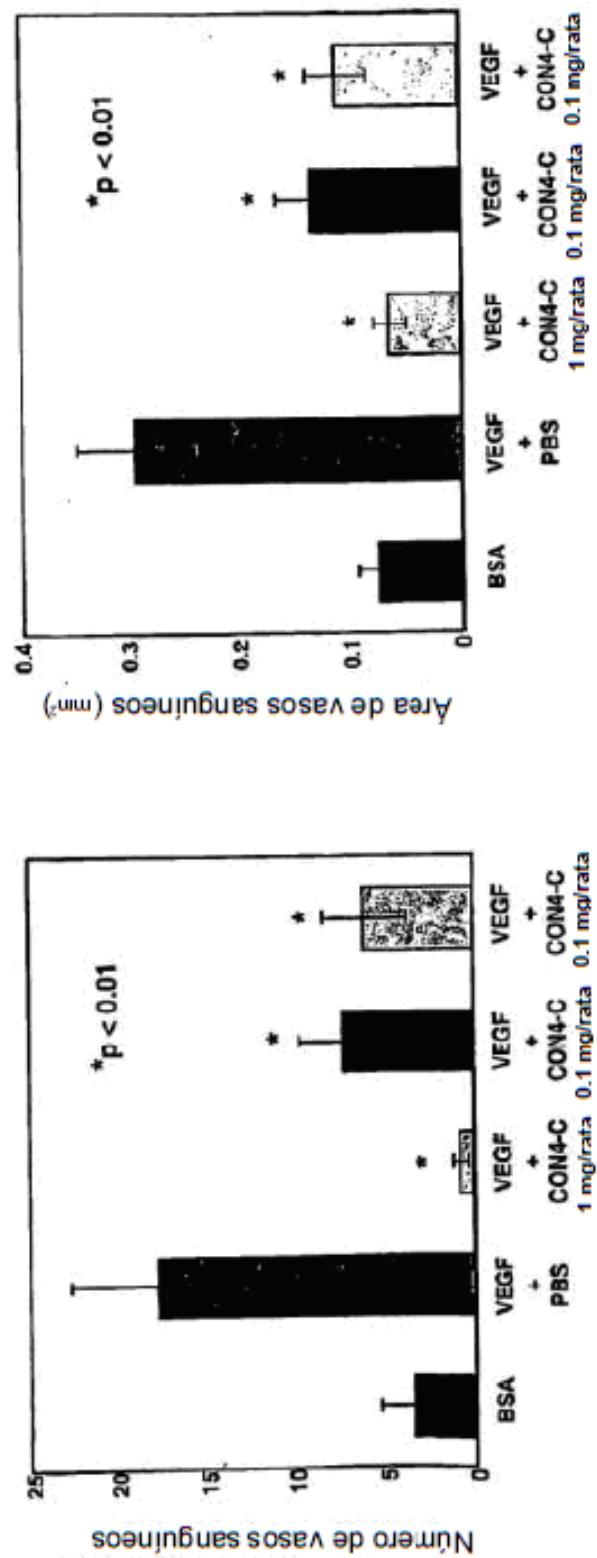
Anticuerpos Anti-Ang2 inhiben pérdida de densidad mineral en el modelo de artritis inducido por adyuvante



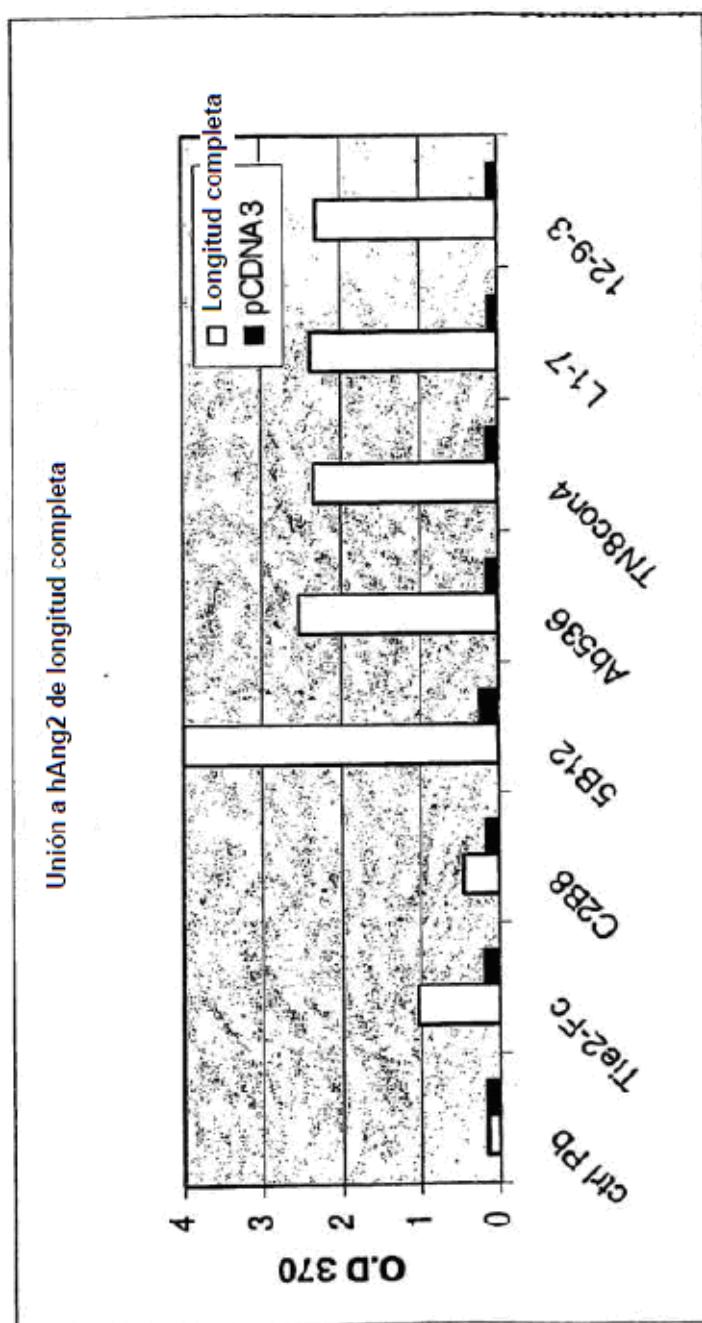
*Figura 11c*  
Efecto de pepticuerpos Anti-Ang2 en pérdida de peso corporal en el modelo de artritis inducido por adyuvante



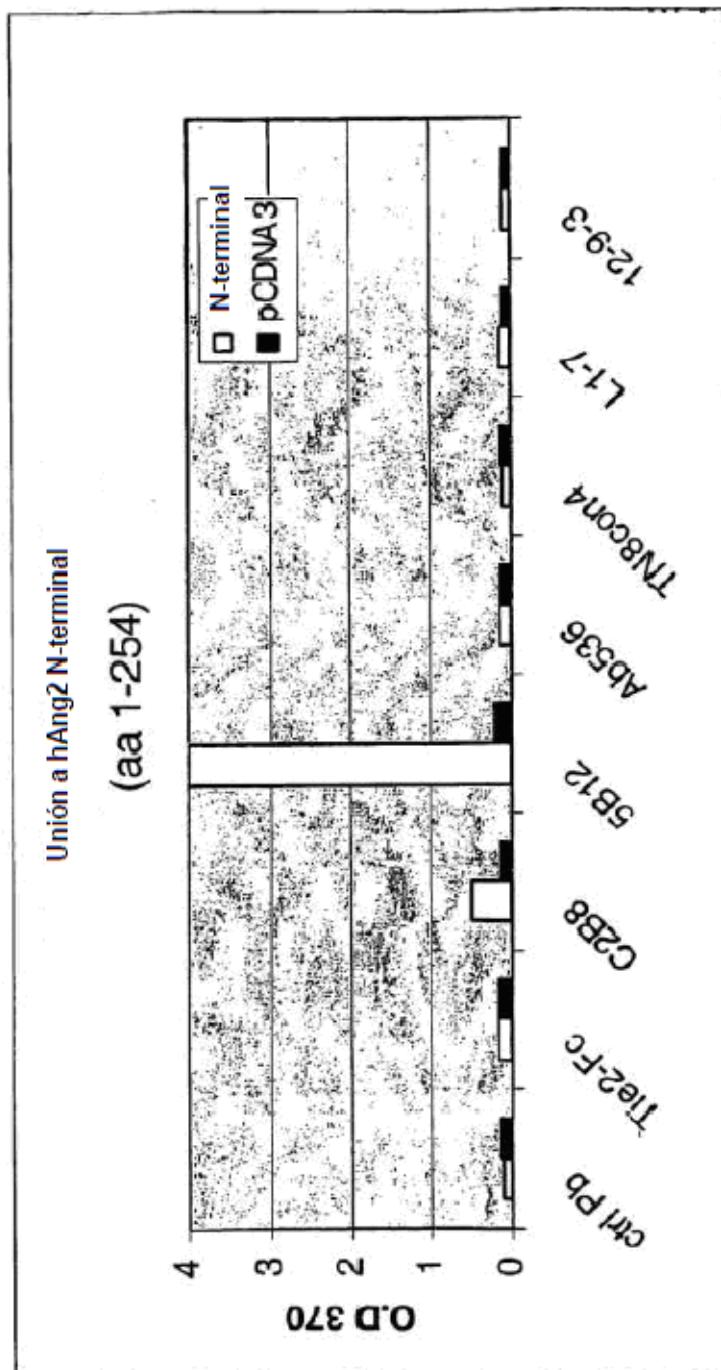
*Figura 12*  
Pepticuerpo CON4-C inhibe angiogénesis de  
córnea inducida por VEGF.



*Figura 13a*  
Mapec de epitopos



*Figura 13b*  
Mapeo de epítopos



*Figura 1.3c*  
Mapeo de epítópos



Figura 14

